

# Estudi de la significació cel·lular dels “lípidis mòbils” visibles per RMN en cèl·lules C6 de glioma de rata

Memòria presentada per MariaRosa Quintero Bernabeu per optar al grau de Doctora en Bioquímica per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció del Professor Carles Arús Caraltó

Vist-i-plau del director de la tesi

Professor Carles Arús i Caraltó

MariaRosa Quintero Bernabeu

Cerdanyola del Vallès, 8 de gener de 2007



ALWAYS LOOK ON THE BRIGHT SIDE OF LIFE

**MONTY PYTHON**, *Life of Brian*

# Agraïments

Tenia moltes ganes d'escriure aquesta pàgina d'agraïments, perquè significa que ja he arribat al final de la tesi, i al mateix temps és tot un compromís, perquè és la que més gent llegirà. Comencem.

En primer lloc, volia agrair al professor Carles Arús que m'acceptés per treballar en el seu grup, ara fa set anys, i que hagi estat el meu pare científic.

En el GABRMN hi treballa, i hi ha treballat, molta gent, a la qual tinc molt per agrair. Als que hi eren quan vaig començar: a la Yolanda i al Ignasi, per haver-me ajudat en els primers passos en el món de les gotícules lipídiques. A la Katja, per la seva alegria i la seva disponibilitat total per ajudar a tothom. A l'AnaPaula, pels anys d'amistat, per la complicitat i el recolzament. A la Marga, pel seu sentit de l'humor, tan especial, i pels congressos compartits. Als que vingueren després: al Rui, per ser una de les persones més nobles que conec, per haver dipositat en mi la seva confiança, i per escoltar-me i aconsellar-me tantes vegades; al primer equip informàtic: Jordi Montero, Jordi Nebot, Guillem Mercadal i Lluís Martí, pels aires nous que van portar al labo. I als més recents: JorgeLuís, per les converses, Sergi pel suport, Juana i Teresa, pels somriures, l'alegria i les ganes de treballar. I a tota la resta del grup, pels bons moments compartits.

Al Miquel Cabañas, i resumint, gràcies per tot. Literalment, aquesta tesi no hauria pogut ser sense el teu ajut.

A la gent de la unitat, pel recolzament i les pernilades. Especialment al Dr. Sal-

vador Bartolomé, pel seu bon fer al LAFEAL i per estar sempre disposat a escoltar, i a l'Helena Carbó, per tenir sempre un somriure als llavis, i per ajudar-nos sempre en tot. A la Sílvia Caño i la Doris Salerno, per la nostra amistat, i al Marc Martín, per continuar en contacte.

Al grup del Dr. Enrique Claro, de l'Institut de Neurociències, pel suport logístic en els experiments d'inducció d'apoptosi i de citometria de flux, i al Dr. Marco A. Fernández, de la Unitat de Citometria de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, per l'anàlisi de les dades de citometria.

A la Judit i al Jose Carlos, per tantes coses, però sobretot per ser per mi un exemple fins i tot en la distància.

En els anys que he treballat en aquest departament he desenvolupat a més d'una tasca investigadora, una tasca docent. En aquest vessant hi ha algunes persones a qui vull expressar el meu agraïment.

Al Dr. Esteve Padrós, al Dr. Joan-Ramon Daban i al Dr. Carles Arús, per confiar en la meva capacitat com a docent durant tots aquests anys.

A les persones que han desenvolupat la tasca de Coordinador de pràctiques: Dr. Josep Vendrell, Dra. Virtudes (Sandra) Villegas i Dra. Ester Boix, per fer possible les pràctiques.

Al Jordi Esteve, per tenir-ho tot sempre preparat a temps, fins i tot quan semblava impossible.

Als companys profes de pràctiques, el suport i l'ajut. Especialment al Dr. Mohammed Moussauoi i la Dra. Rosario Fernández, per ensenyar-me quan vaig arribar, i al Dr. Mario Ferrer, per convertir les pràctiques de Vacunes i Fàrmacs en les més divertides que he fet mai.

I sobretot i principalment a tots els alumnes amb els que he treballat, per tot el què m'han ensenyat i per tot el què amb ells he après.

I finalment, a la meva família, als meus pares, al Tete i a la Sue, per l'amor i

el recolzament. A la Marta, per acceptar-me a la seva família com una més. I al Lluís, per ensenyar-me tantes coses, però sobretot, per ensenyar-me a riure'm de mi mateixa, que em feia molta falta.

# Índex

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Agraïments</b>   | <b>i</b>    |
| <b>Índex de figures</b>   | <b>xi</b>   |
| <b>Índex de taules</b>  | <b>xv</b>   |
| <b>Abreviacions</b>   | <b>xvii</b> |
| <b>1 Introducció</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Introducció a la ressonància magnètica nuclear (RMN) . . . . .                      | 1           |
| 1.1.1 El fenomen de la ressonància . . . . .  | 1           |
| 1.1.2 L'experiment d'RMN monodimensional de transformada de<br>Fourier . . . . .        | 4           |
| 1.1.3 Paràmetres espectrals . . . . .   | 5           |
| 1.1.4 L'RMN bidimensional . . . . .   | 10          |
| 1.2 Aplicacions de l'RMN a l'estudi de sistemes vius . . . . .                          | 13          |
| 1.2.1 Imatgeria i espectrosòpia de ressonància magnètica . . . . .                      | 13          |
| 1.2.2 L'RMN en l'estudi del càncer. Els tumors cerebrals. . . . .                       | 18          |
| 1.3 Lípids mòbils i gotícules lipídiques . . . . .                                      | 20          |
| 1.3.1 Localització subcel·lular dels lípids que originen els senyals<br>de ML . . . . . | 22          |
| 1.3.2 Origen metabòlic dels lípids que originen els senyals de ML .                     | 30          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 1.3.3    | Metabolisme de gotícules lipídiques i lípids neutres en cèl·lules eucariotes. . . . . | 42        |
| 1.4      | Cèl·lules C6 com a model . . . . .  | 49        |
| <b>2</b> | <b>Objectius</b>  | <b>53</b> |
| <b>3</b> | <b>Experimental</b>   | <b>55</b> |
| 3.1      | Cultiu cel·lular . . . . .  | 55        |
| 3.1.1    | Optimització de les condicions de cultiu de les cèl·lules C6 . . . . .                | 55        |
| 3.1.2    | Tripsinització dels cultius . . . . .   | 56        |
| 3.2      | Cultiu de cèl·lules C6 ATCC . . . . .   | 57        |
| 3.2.1    | Condicions estàndard de cultiu . . . . .  | 57        |
| 3.2.1.1  | Recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 75 cm <sup>2</sup> . . . . .        | 58        |
| 3.2.1.2  | Recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 500 cm <sup>2</sup> . . . . .       | 58        |
| 3.2.2    | Condicions especials de cultiu . . . . .  | 59        |
| 3.2.2.1  | Incubació de les cèl·lules amb ACSF . . . . .   | 59        |
| 3.2.2.2  | Incubació de les cèl·lules amb [1]- <sup>13</sup> C-glucosa . . . . .                 | 59        |
| 3.2.2.3  | Cultiu de cèl·lules per detecció d'apoptosi . . . . .                                 | 60        |
| 3.2.2.4  | Inducció d'apoptosi . . . . .   | 60        |
| 3.2.3    | Corba de creixement de les cèl·lules C6 ATCC . . . . .                                | 60        |
| 3.3      | Microscòpia òptica (MO) . . . . .   | 61        |
| 3.3.1    | Tinció de gotícules lipídiques . . . . .  | 61        |
| 3.3.2    | Mesures de volums cel·lulars i de volums de gotícules . . . . .                       | 62        |
| 3.3.3    | Mesures del percentatge d'apoptosi . . . . .  | 63        |
| 3.4      | Citometria de flux i cicle cel·lular . . . . .  | 64        |
| 3.5      | Extractes lipídics cel·lulars . . . . .   | 64        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.6      | Quantificació de proteïna . . . . .  | 65        |
| 3.7      | Cromatografia en capa prima (TLC) . . . . .  | 65        |
| 3.7.1    | Validació del mètode de quantificació per anàlisi d'estàndards<br>i extractes . . . . .                  | 67        |
| 3.7.2    | Extractes lipídics cel·lulars . . . . .  | 68        |
| 3.8      | Experiments d'espectroscòpia d'RMN . . . . .   | 68        |
| 3.8.1    | Preparació de mostres . . . . .  | 70        |
| 3.8.2    | Experiments d'RMN monodimensional . . . . .  | 71        |
| 3.8.2.1  | Experiments de $^1\text{H}$ -RMN . . . . .   | 71        |
| 3.8.2.2  | Experiments de $^{13}\text{C}$ -RMN . . . . .  | 74        |
| 3.8.3    | Experiments d'RMN bidimensional . . . . .  | 74        |
| 3.8.3.1  | Experiments $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY . . . . .   | 74        |
| 3.8.3.2  | Experiments $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC . . . . .   | 75        |
| 3.9      | Anàlisi estadística de les dades . . . . .   | 76        |
| <b>4</b> | <b>Resultats i discussió</b> . . . . .   | <b>77</b> |
| 4.1      | Cultiu, experiments de microscòpia òptica i citometria de flux de cèl·lules<br>C6 . . . . .              | 77        |
| 4.1.1    | Experiments d'optimització de la corba d'aparició de gotícules<br>en cèl·lules C6 ECACC i ATCC . . . . . | 77        |
| 4.1.2    | Cultiu de cèl·lules C6 ATCC . . . . .  | 78        |
| 4.1.3    | Microscòpia òptica (MO) . . . . .  | 80        |
| 4.1.3.1  | Corba d'aparició de gotícules . . . . .  | 80        |
| 4.1.3.2  | Mesures de volums cel·lulars i de volums de gotícules . . . . .  | 80        |
| 4.1.4    | Mesures del percentatge d'apoptosi per tinció amb DAPI i mi-<br>croscòpia de fluorescència . . . . .     | 83        |
| 4.1.5    | Citometria de flux i cicle cel·lular . . . . .   | 83        |
| 4.1.6    | Discussió dels resultats . . . . .   | 86        |



|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.2      | Cromatografia en capa prima . . . . .  | 89         |
| 4.2.1    | Optimització del mètode . . . . .  | 89         |
| 4.2.2    | Quantificació dels lípids neutres presents en extractes lipídics<br>de cèl·lules C6 . . . . .  | 96         |
| 4.2.3    | Caracterització de la taca no identificada amb $R_f = 0,696$ . . . . .   | 101        |
| 4.2.4    | Discussió dels resultats dels experiments de TLC . . . . .   | 105        |
| 4.3      | Experiments d'RMN monodimensional de $^1\text{H}$ . . . . .  | 112        |
| 4.3.1    | Estàndards . . . . .   | 112        |
| 4.3.2    | Cèl·lules C6 intactes . . . . .  | 113        |
| 4.3.3    | Extractes lipídics de cèl·lules C6 . . . . .   | 119        |
| 4.3.4    | Discussió dels resultats d'RMN monodimensional de $^1\text{H}$ . . . . .   | 120        |
| 4.4      | Experiments d'RMN monodimensional de $^{13}\text{C}$ . . . . .   | 123        |
| 4.4.1    | Estàndards . . . . .   | 123        |
| 4.4.2    | Extractes lipídics de cèl·lules C6 . . . . .   | 126        |
| 4.4.3    | Discussió dels resultats d'RMN monodimensional de $^{13}\text{C}$ . . . . .  | 129        |
| 4.5      | Experiments d'RMN bidimensional . . . . .  | 131        |
| 4.5.1    | Estàndards . . . . .   | 131        |
| 4.5.2    | Extractes de cèl·lules C6 en condicions estàndard de cultiu . . . . .  | 132        |
| 4.5.3    | Extractes de cèl·lules C6 incubades amb $[1]\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa . . . . .  | 138        |
| 4.5.4    | Discussió dels resultats dels experiments d'RMN bidimensional  | 142        |
| <b>5</b> | <b>Discussió general</b>   | <b>149</b> |
| 5.1      | Contingut de ML quantificat per espectrosòpia d'RMN i epifluores-<br>cència basada en <i>Nile Red</i> de cèl·lules C6 intactes . . . . . | 149        |
| 5.2      | Lípids neutres per TLC . . . . .   | 150        |
| 5.3      | Comparació de les dades de quantificació per TLC, RMN i MO . . . . .   | 151        |
| 5.4      | Experiments d' RMN de mostres marcades amb $[1]\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa . . . . .   | 157        |
| 5.5      | La hipòtesi de la llançadora de TAG . . . . .  | 159        |

|   |            |
|---|------------|
| <i>ÍNDEX</i>  | ix         |
| <b>6 Conclusions</b>  | <b>171</b> |
| <b>Bibliografia</b>   | <b>173</b> |
| <b>A Annex</b>  | <b>199</b> |
| A.1 Experiments de pols i adquisició de $^1\text{H}$ -RMN . . . . . | 199        |
| A.2 Experiments d'eco d'spin de $^1\text{H}$ -RMN . . . . .         | 201        |
| A.3 Experiments de $^{13}\text{C}$ -RMN . . . . .                   | 203        |
| A.4 Experiments $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY . . . . .         | 204        |
| A.5 Experiments $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC . . . . .      | 206        |
| <b>B Articles</b>   | <b>209</b> |

# Índex de figures

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.1  | Distribució dels nuclis en els diferents estats energètics en aplicar un camp magnètic, cas d' spin $1/2$ . . . . .                   | 3  |
| 1.2  | Vector magnetització d'una mostra . . . . .   | 4  |
| 1.3  | Esquema del procés de transformada de Fourier per passar de la FID a l'espectre . . . . .   | 5  |
| 1.4  | Exemple del què seria la seqüència d'RMN monodimensional més senzilla. . . . .  | 6  |
| 1.5  | Representació del desplaçament químic $\delta$ , l'alçada $a$ i l'amplada a mitja alçada $\Delta\nu_{1/2}$ d'un senyal d'RMN. . . . . | 7  |
| 1.6  | Relació entre el valor dels temps de relaxació $T_1$ i $T_2$ i el temps de correlació d'una molècula . . . . .                        | 10 |
| 1.7  | Esquema general d'un experiment d'RMN bidimensional . . . . .   | 11 |
| 1.8  | Esquema d'un espectre COSY per dos nuclis A i X acoblats . . . . .  | 12 |
| 1.9  | Esquema d'un espectre HMQC per dos nuclis 1 i 2 acoblats . . . . .  | 13 |
| 1.10 | Imatge d'MRI d'un pacient diagnosticat de glioblastoma . . . . .  | 16 |
| 1.11 | Espectres de voxels de tumors cerebrals . . . . .   | 20 |
| 1.12 | Espectre de $^1\text{H}$ -RMN de cèl·lules de la línia de carcinoma de mama 13762 (Mountford <i>et al.</i> , 1984). . . . .           | 23 |
| 1.13 | Model de domini lipídic intramembrana proposat per Mountford i col·laboradors (Mountford & Wright, 1988) . . . . .                    | 24 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.14 | Espectres de 1D- <sup>1</sup> H-RMN a 136 ms de temps d'eco i imatges de microscòpia òptica de fluorescència de cèl·lules C6 (Barba <i>et al.</i> , 1999) . . . . .                     | 28 |
| 1.15 | Espectres de <sup>1</sup> H-RMN ponderats en difusió de cèl·lules DU145 de carcinoma de pròstata humana perfundides crescudes en poliestirè (Milkevitch <i>et al.</i> , 2005) . . . . . | 33 |
| 1.16 | Esquema dels esdeveniments periòdics que es produeixen en el metabolisme de fosfolípids al llarg del cicle cel·lular (Jackowski & Fagone, 2005) . . . . .                               | 36 |
| 1.17 | Regulació de la distribució d'àcids grassos per la biosíntesi de la PtdCho a través de l'activitat de l'enzim CCT. . . . .  | 37 |
| 1.18 | Vies de síntesi de fosfolípids modificat de Podo (Podo, 1999) . . . . .   | 38 |
| 1.19 | Rutes del metabolisme de triacilglicerols (Coleman & Lee, 2004) . . . . .   | 46 |
| 1.20 | Esquema de la formació de gotícules lipídiques en adipòcits (Murphy & Vance, 1999) . . . . .  | 48 |
| 3.1  | Insert per augmentar el volum aparent de mostra (Catàleg Wilmad, EUA) . . . . .   | 71 |
| 4.1  | Corba de creixement de les cèl·lules C6 . . . . .   | 79 |
| 4.2  | Histograma d'aparició de gotícules lipídiques en les cèl·lules C6 . . . . .   | 81 |
| 4.3  | Cèl·lules C6 tenyides amb <i>Nile Red</i> i estudiades per microscòpia òptica . . . . .   | 81 |
| 4.4  | Cèl·lules tenyides amb DAPI observades per microscòpia òptica. . . . .  | 83 |
| 4.5  | Histogrames obtinguts en els experiments de mesura de cicle cel·lular en cèl·lules C6 per citometria de flux . . . . .  | 86 |
| 4.6  | TLC de separació dels estàndards que es pretenen identificar en un extracte de cèl·lules C6 . . . . .   | 92 |
| 4.7  | TLC on es mostren els dos tipus de contaminació més freqüents en les capes primes. . . . .  | 93 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.8  | TLC on es mostra la contaminació en una capa prima d'extractes lipídics. . . . .   | 93  |
| 4.9  | TLC on es mostra la contaminació en una capa prima de tripalmitin.   | 94  |
| 4.10 | Imatge de la selecció de bandes en les TLCs emprant el programa QuantityOne de BioRad . . . . .                                      | 97  |
| 4.11 | Rectes de calibratge per TLC dels lípids neutres a quantificar en els extractes. . . . .   | 98  |
| 4.12 | TLC de tripalmitin i monogalactosil diacilglicerol en hexà:dietilèter:àcid acètic . . . . .  | 102 |
| 4.13 | TLC per la identificació del compost monogalactosildiactilglicerol en extractes lipídics de cèl·lules C6. . . . .                    | 103 |
| 4.14 | Recta de calibratge del compost monogalactosildiactilglicerol . . . . .  | 103 |
| 4.15 | TLC d'extractes per identificar la presència d'éter de DAG . . . . .   | 104 |
| 4.16 | Estructura química de l'éter de DAG 1-O-palmitil-2,3-dipalmitoil-rac-glicerol . . . . .  | 104 |
| 4.17 | Corba de creixement de les cèl·lules HeLa emprades en els experiments de Rosi i col·laboradors (Rosi <i>et al.</i> , 1999) . . . . . | 108 |
| 4.18 | Estructura química dels plasmalògens comparada amb la dels fosfolípids d'origen . . . . .  | 113 |
| 4.19 | Estructura química i nomenclatura emprada en els principals lípids estudiats en aquesta tesi. . . . .                                | 114 |
| 4.20 | Espectre de 1D- <sup>1</sup> H-RMN del compost tripalmitin . . . . .   | 115 |
| 4.21 | Espectres de 1D- <sup>1</sup> H-RMN de cèl·lules C6 en les diferents fases d'estudi.   | 117 |
| 4.22 | Espectre de 1D- <sup>1</sup> H-RMN d'un extracte lipídic de cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu . . . . .                                | 121 |
| 4.23 | Espectre de <sup>13</sup> C-RMN del compost tripalmitin . . . . .  | 127 |
| 4.24 | Espectres de <sup>13</sup> C-RMN d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu . . . . .   | 128 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.25 | Espectre HMQC d'una barreja d'estàndards lipídics . . . . .  | 133 |
| 4.26 | Ampliació de la regió dels senyals dels carbonis del glicerol en l'espectre HMQC d'una barreja de tripalmitin i dipalmitin . . . . .                   | 134 |
| 4.27 | Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 4 de cultiu  | 135 |
| 4.28 | Ruta de conversió de glucosa a DAG, TAG i PL segons Mathews (Mathews <i>et al.</i> , 2000). . . . .  | 136 |
| 4.29 | Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 4 de cultiu tractades amb [1]- <sup>13</sup> C-glucosa . . . . .                               | 139 |
| 4.30 | Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 7 de cultiu tractades amb [1]- <sup>13</sup> C-glucosa . . . . .                               | 140 |
| 4.31 | Comparació entre els espectres HMQC dels extractes de cèl·lules abundància natural i dels extractes de cèl·lules marcades amb <sup>13</sup> C. . . . . | 143 |
| 4.32 | Distribució de marcatge obtinguda per cèl·lules C6 de dia 4 de cultiu  | 145 |
| 4.33 | Distribució del marcatge obtinguda per cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu   | 147 |
| 4.34 | Ruta de conversió de glucosa a DAG, TAG i PL segons la distribució del marcatge en els productes. . . . .  | 148 |
| 5.1  | Rutes de síntesi de TAG, DAG i PL a partir de precursors "freds" . .   | 158 |
| 5.2  | Esquema de la dinàmica de les gotícules lipídiques citosòliques que contenen TAG en cèl·lules C6 . . . . .   | 160 |
| 5.3  | Descripció de la situació cel·lular segons les dades de marcatge . . .   | 167 |

# Índex de taules

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 3.1  | Condicions emprades en l'optimització del cultiu de cèl·lules C6 . . .   | 56  |
| 4.1  | Efecte de les variacions de les condicions de cultiu en cèl·lules C6<br>ECACC en fase exponencial tripsinitzades per la condició 1 . . . . .   | 78  |
| 4.2  | Mesures de diàmetres de cèl·lules i gotícules per microscòpia òptica .   | 84  |
| 4.3  | Mesures de cicle cel·lular per citometria de flux . . . . .  | 85  |
| 4.4  | Rfs dels estàndards lipídics en les TLCs obtingudes en hexà:dietilèter:àcid<br>acètic . . . . .  | 91  |
| 4.5  | Assignació de les taques de les TLCs inicials d'extractes lipídics cel·lulars<br>obtingudes en hexà:dietilèter:àcid acètic . . . . .           | 91  |
| 4.6  | Variabilitat del mètode de TLC segons la concentració i volum de<br>mostra aplicats . . . . .  | 96  |
| 4.7  | Quantificació per TLC dels lípids neutres en extractes de cèl·lules C6   | 99  |
| 4.8  | Densitat òptica de la taca d' $R_f = 0,696$ en les diferents situacions estu-<br>diades . . . . .  | 105 |
| 4.9  | Recull de dades de quantificació de lípids neutres en diferents siste-<br>mes cel·lulars . . . . .   | 110 |
| 4.10 | Assignacions dels senyals observats en experiments d' $1D-^1H$ -RMN<br>d'eco d'espín ( $T_e = 136$ ms) de sediments de cèl·lules C6 . . . . .  | 116 |
| 4.11 | Quocients entre les alçades dels senyals d'interès en els espectres d' $1D-^1H$ -<br>$^1H$ -RMN d'extractes lipídics de cèl·lules C6 . . . . . | 119 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.12 | Assignacions temptatives dels espectres d'extractes a partir dels espectres de $^1\text{H}$ -RMN i $^{13}\text{C}$ -RMN d'estàndards. . . . .  | 123 |
| 4.13 | Variacions en la intensitat dels senyals deguda a l'enriquiment amb $^{13}\text{C}$ en els espectres d' $1\text{D}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN d'extractes de cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu. . . . . | 129 |
| 4.14 | Valors promig del quocient de la integral dels senyals d'interès respecte del senyals de colina en els espectres HMQC d'extractes . . . .  | 141 |



# Abreviacions

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ACSF                            | <i>Artificial cerebrospinal fluid</i> , fluid cefaloraquidi artificial |
| AG                              | àcids grassos  |
| AGL                             | àcids grassos lliures  |
| ATCC                            | <i>American Tissue Culture Collection</i>                              |
| BSA                             | <i>bovine serum albumine</i> , albúmina de sèrum boví                  |
| C <sup>2</sup> HCl <sub>3</sub> | cloroform deuterat   |
| Cre                             | Creatina   |
| DO                              | densitat òptica  |
| DAPI                            | 4',6-diamidino-2-fenilindole   |
| ECACC                           | <i>European Collection of Cell Cultures</i>                            |
| EDTA                            | àcid etilendiaminatetraacètic  |
| EstCol                          | èsters de colesterol   |
| DAG                             | diacilglicerol   |
| DMEM                            | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                                |
| FCS                             | <i>foetal calf serum</i> , serum fetal de vedella                      |

---

la taula continua a la següent pàgina

Taula 1: (continuació)

---

|                         |  |
|-------------------------|--|
| FID                     | <i>free inductions decay</i>   |
| gtf                     | grams de teixit fresc  |
| HBSS                    | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>                                 |
| $^2H_2O$                | aigua deuterada  |
| JR                      | jump-and-return  |
| MGDAG                   | monogalactosildiàcilglicerol   |
| ML                      | <i>NMR-visible Mobile Lipids</i> , lípids<br>mòbils visibles per RMN |
| MO                      | Microscòpia òptica   |
| NOE                     | <i>Nuclear Overhauser Effect</i> , efecte nu-<br>clear Overhauser    |
| NS                      | <i>number of scans</i> , nombre d'adquisi-<br>cions                  |
| PBS                     | <i>phosphate buffered saline</i> , tampó fos-<br>fat salí            |
| PC- <i>plc</i>          | fosfolipasa C de fosfatidilcolina                                    |
| pl                      | picolitres   |
| PL                      | fosfolípids  |
| <i>pla</i> <sub>2</sub> | fosfolipasa A2   |
| <i>pld</i>              | fosfolipasa D  |
| ppm                     | parts per milió  |
| PtdCho                  | fosfatidilcolina   |
| PtdEtAmina              | fosfatidiletanolamina  |
| RE                      | reticle endoplàsmic  |

---

la taula continua a la següent pàgina

Taula 1: (continuació)

---

|       |   |
|-------|---|
| Rf    | <i>retention factor</i> , factor de retenció                                      |
| SNR   | <i>signal-to-noise ratio</i> , relació senyal-soroll                              |
| TAG   | triacilglicerol   |
| TLC   | <i>thin-layer chromatography</i> , cromatografia en capa prima                    |
| WALTZ | <i>wideband alternating-phase low-power technique for zero-residual splitting</i> |

# Introducció

## 1.1 Introducció a la ressonància magnètica nuclear (RMN)

El 1946 dos grups de recerca independents, el de Bloch i el de Purcell, van observar per primera vegada senyals de ressonància magnètica nuclear. El 1952, Bloch i Purcell van obtenir el premi Nobel de Física pels seus descobriments. Des de llavors la ressonància magnètica nuclear no ha deixat d'evolucionar, i ha esdevingut una tècnica indispensable en els camps de la química, la bioquímica, la física i, més recentment, de la medicina.

### 1.1.1 El fenomen de la ressonància

El fenomen de la ressonància magnètica nuclear es produeix quan irradiem una mostra sotmesa a un camp magnètic extern  $B_0$  amb una ona de la freqüència adient, tant al camp magnètic com als nuclis que es vulguin estudiar. Molts nuclis atòmics, pel fet de ser càrregues, tenen un vector moment magnètic  $\mu$ . El moment nuclear angular d'un nucli es defineix com:

$$P = \sqrt{I(I + 1)} \frac{h}{2\pi} \quad (1.1)$$

on  $h$  és la constant de Planck i  $I$  és l'spin nuclear. El moment magnètic d'spin d'un nucli es defineix com:

$$\mu = \gamma \cdot P \quad (1.2)$$

on  $\gamma$  és la constant giromagnètica i  $P$  és el moment nuclear angular.

Només els nuclis amb un  $I$  diferent de zero són detectables per RMN, i la constant giromagnètica  $\gamma$  determina la sensibilitat de la tècnica per detectar un nucli concret. El vector  $\mu$ , col·locat dins d'un camp magnètic, presenta moviment de precessió al voltant de l'eix del camp extern, és a dir, els nuclis giren sobre si mateixos amb una velocitat angular:

$$\omega_0 = -\gamma \cdot B_0 \quad (1.3)$$

el vector  $\mu$  pot presentar  $(2I + 1)$  orientacions respecte del camp. En el cas més simple, per  $I = 1/2$ , només hi ha dues possibles orientacions de  $\mu$ . Això provoca que en la mostra hi hagi dos estats energètics possibles, un de major i un de menor energia (figura 1.1). Per la llei de distribució de Boltzman (Equació 1.4) es pot calcular la diferència de poblacions entre els dos estats  $\alpha$  i  $\beta$ . En condicions normals ( $25^\circ \text{C}$ , 1 atm), la població en l'estat de menor energia ( $N_\beta$ ) és superior a la població de l'estat de major energia ( $N_\alpha$ ).

$$N_\beta/N_\alpha = \exp(-\Delta E/k_B \cdot T) \quad (1.4)$$

on  $k_B$  és la constant de Boltzman i  $T$  és la temperatura absoluta.

La diferència d'energies entre els dos estats és:

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 = h \cdot \nu \quad (1.5)$$

Per tant, i aïllant en l'equació 1.5, per provocar la transició dels nuclis de l'estat de

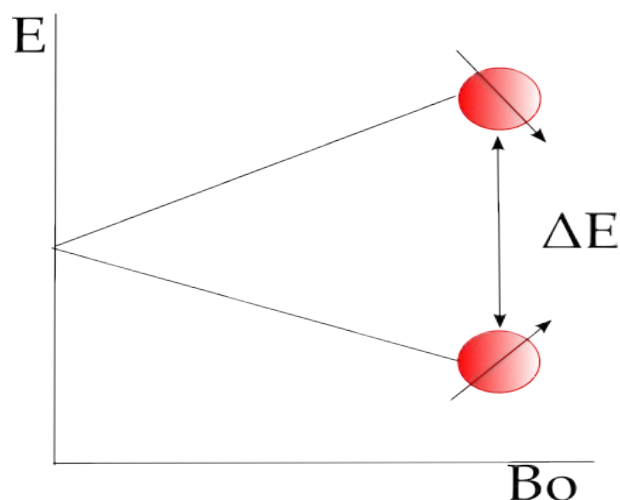


Figura 1.1: Distribució dels nuclis en els diferents estats energètics en aplicar un camp magnètic, cas d'espín 1/2

menor al estat de major energia, cal irradiar la mostra amb una radiació de freqüència:

$$\nu_L = \frac{\omega_0}{2\pi} \quad (1.6)$$

és a dir, la freqüència de precessió del moment magnètic del nucli al voltant del camp  $B_0$  o freqüència de Larmor.

En una representació macroscòpica, observariem el vector magnetització de la mostra  $M_0$  o vector suma de tots els vectors moment magnètic dels nuclis de la mostra, que en repòs seria un vector en el mateix sentit i direcció que el camp magnètic extern (figura 1.2). A diferència del vector  $\mu$ , el qual està quantitzat i només pot trobar-se en un dels dos possibles estats energètics, el vector magnetització  $M_0$  no està quantitzat i presenta un nombre continu d'estats.

Per simplificar el sistema, s'introdueix el concepte de sistema de coordenades rotatori, un sistema de coordenades que gira a la mateixa velocitat angular  $\omega_0$  que el vector  $\mu$ , de manera que en el sistema de coordenades giratori aquest vector no estigui en moviment.

Quan la mostra s'irradia amb una freqüència  $\nu_L$ , s'acompleix la condició de res-

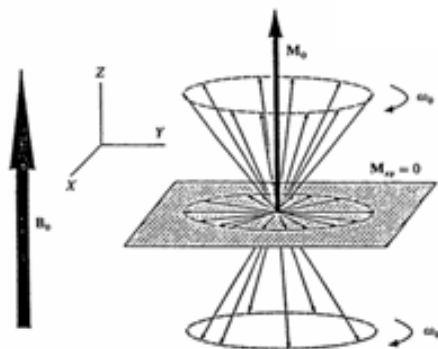


Figura 1.2: Vector magnetització global o macroscòpica d'una mostra sotmesa a un camp magnètic extern

sonància. Aquesta irradiació s'aconsegueix aplicant un camp magnètic oscil·lant  $B_1$  al llarg de l'eix  $X$ , és a dir, perpendicular al camp  $B_0$ . Aquesta radiació proporciona l'energia necessària per permetre el salt energètic dels nuclis de l'estat de menor a l'estat de major energia, i provoca el desplaçament del vector magnetització de la seva posició original ( $M_z = M_0$ ), provocant doncs l'aparició de magnetització en el pla  $xy$  ( $M_{xy}$ ).

Mentre el sistema torna a l'estat energètic inicial és possible obtenir informació sobre el sistema. El senyal que s'obté és una sinusoide atenuada (FID, *free induction decay*) que decau a mida que  $M_{xy}$  desapareix. El tractament de la FID ens permet obtenir un espectre en què estaran representats els nuclis d'un mateix tipus que formin part de la mostra (i.e.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  etc.) (Friebolin, 2005; Gadian, 1995). Aquest tractament consisteix en descomposar la FID en totes les components que la conformen, i representar la informació després d'una transformació de Fourier ràpida en un gràfic d'intensitat vs freqüència, que serà l'espectre (veure figura 1.3).

### 1.1.2 L'experiment d'RMN monodimensional de transformada de Fourier

En el cas de l'experiments monodimensional més senzill, la mostra es col·loca dins del camp magnètic, s'excita amb una radiofreqüència que provoqui que  $M_z = 0$  i

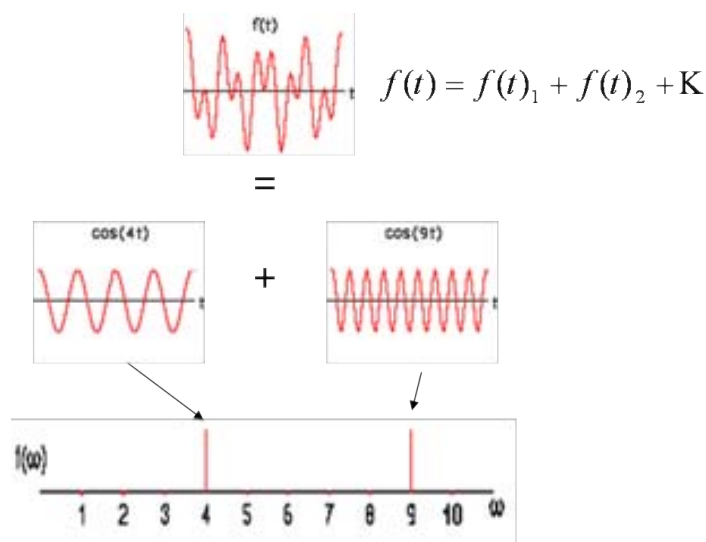


Figura 1.3: Esquema del procés de transformada de Fourier per passar de la FID a l'espectre

$M_{xy} = M_0$  (pols de  $90^\circ$  C) i es recull la informació del retorn de la magnetització a la posició original (figura 1.4). La FID és processada per obtenir l'espectre.

### 1.1.3 Paràmetres espectrals

Els paràmetres essencials per interpretar la informació continguda en un espectre són els següents:

- Desplaçament químic

És la posició que ocupa un senyal en l'espectre (figura 1.5). Cada nucli té una freqüència de ressonància característica, que determina la seva posició en l'espectre. Aquesta freqüència depèn del camp magnètic al qual es faci l'experiment. Per fer comparables espectres obtinguts a diferents camps magnètics, el desplaçament químic  $\delta$  s'expressa emprant les parts per milió, que es calculen:

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_R} \times 10^6 \quad (1.7)$$

on  $\nu_s$  és la freqüència de ressonància (Hz) característica del nucli a aquell camp



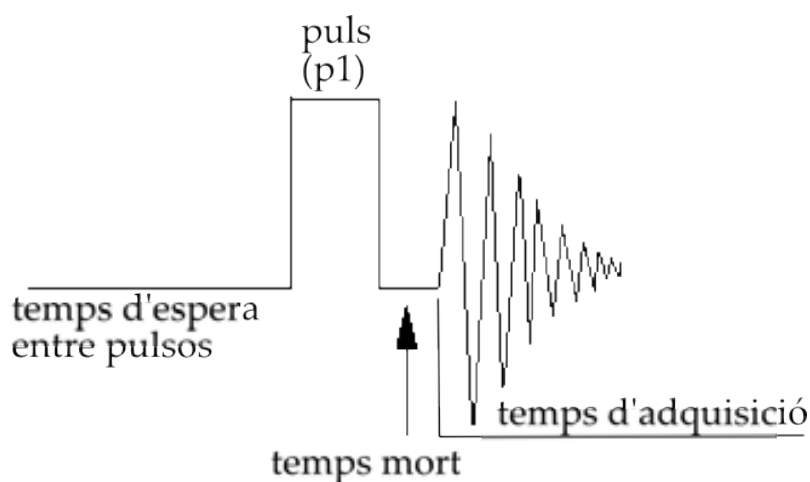


Figura 1.4: Exemple del què seria la seqüència d'RMN monodimensional més senzilla.

magnètic  $B_0$  i  $\nu_R$  és la freqüència de referència. L'escala de parts per milió (ppm) permet que tots els espectres d'una mateixa mostra siguin comparables entre si independentment de l'aparell on s'hagin obtingut, ja que referencien la freqüència característica de cada nucli amb una freqüència de referència que depèn del camp magnètic on s'haig obtingut l'espectre. El desplaçament químic depèn de diversos factors, principalment el tipus de nucli d'estudi, l'entorn químic d'aquest nucli, el medi en què es trobi la mostra i els centres paramagnètics propers al nucli.

- Intensitat i amplada del senyal

Entenem per intensitat l'àrea del senyal. Està relacionada directament amb la concentració de nuclis que donen lloc a aquell senyal. L'amplada del senyal a mitja alçada dóna una idea de la correcció de les condicions instrumental d'adquisició de l'espectre: com més estret és el senyal, millor és la seva qualitat (figura 1.5). Aquest paràmetre es pot optimitzar experimentalment, però factors com la temperatura, el camp magnètic i la relaxació transversal (veure més avall) afectaran al seu valor.

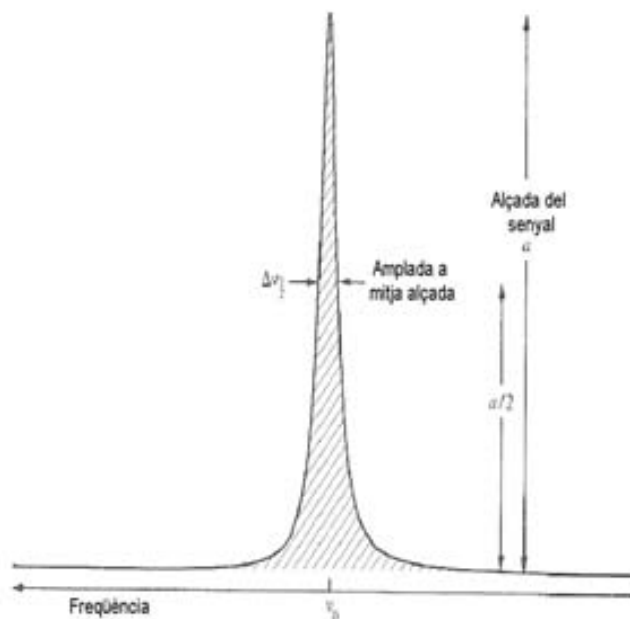


Figura 1.5: Representació del desplaçament químic  $\delta$ , l'alçada  $a$  i l'amplada a mitja alçada  $\Delta\nu_{1/2}$  d'un senyal d'RMN.

- Multiplicitat d'un senyal

És el resultat de la interacció d'un nucli amb els nuclis veïns a través de l'enllaç. Aquesta interacció produeix un desdoblament del senyal, donant lloc a un patró característic. Els factors que determinen la multiplicitat d'un senyal són:

- acoblament amb nuclis iguals: un nucli sent la distribució dels spins dels nuclis pròxims a través dels enllaços. Això provoca que el camp magnètic real sobre aquest nucli estigui modificat pels spins dels nuclis propers en l'estructura, donant lloc al desdoblament dels senyals. Es defineix la constant d'acoblament,  $J$ , com la distància en Hz que separa dos senyals acoblats.
- acoblament amb nuclis diferents: el mateix efecte que es dona degut a nuclis iguals pot produir-se degut a nuclis diferents de l'estudiat, per exemple acoblament de  $^1\text{H}$  amb  $^{13}\text{C}$ .
- desacoblament: en alguns casos pot resultar interessant eliminar alguns

senyals de l'espectre, per simplificar-lo. Això s'aconsegueix saturant un senyal, és a dir, irradiant selectivament un nucli, de manera que s'evita que es vegi afectat pel pols d'excitació. Llavors es perd la interacció dels nuclis que generen aquest senyal amb els nuclis del voltant de la mateixa molècula, i s'eliminen els seus acoblaments.

– simetria: la simetria d'una molècula pot fer que apareguin en l'espectre menys senyals dels esperats *a priori*, ja que algun element de simetria pot relacionar àtoms diferents dins la molècula, convertint-los en químicament equivalents i desapareixent doncs la multiplicitat deguda al seu acoblament.

- Temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$

El retorn del vector magnetització a la posició inicial (és a dir, el retorn dels nuclis a l'estat de menor energia) està controlat pels processos de relaxació longitudinal i transversal, regits per les constants de temps  $T_1$  i  $T_2$  respectivament. Els dos processos de relaxació es donen a l'hora, essent sempre  $T_2 \leq T_1$ .

$T_1$  és el temps de relaxació longitudinal. La relaxació longitudinal està relacionada amb el bescanvi d'energia entre els spins nuclears i el seu entorn molecular. El retorn dels spins a la situació d'equilibri presenta normalment un comportament exponencial, que es pot descriure amb l'expressió:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \Rightarrow M_z = M_0 \cdot (1 - \exp(-t/T_1)) \quad (1.8)$$

És important tenir present el paràmetre  $T_1$  en el disseny experimental, ja que si es torna a adquirir un espectre sense permetre la recuperació total de la magnetització es produeix una atenuació artefactual del senyal. Per tant, sempre cal esperar entre dos polsos un temps mínim de  $3 \times T_1$ , que equival a una

recuperació d' $M_z$  del 95%.

$T_2$  és el temps de relaxació transversal. La relaxació transversal consisteix en interaccions amb spins nuclears veïns sense involucrar a bescanvi net d'energia. L'equació 1.9 expressa el retorn a l'estat d'equilibri.

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \Rightarrow M_{xy} = M_{xy}^0 \cdot \exp(-t/T_2) \quad (1.9)$$

$T_2$  contribueix a l'eixamplament dels senyals de l'espectre d'una manera més intensa que  $T_1$ . A la figura 1.6 es mostra la relació de  $T_1$  i  $T_2$  amb el temps de correlació  $\tau_c$ , que ens dóna una idea de la mobilitat de la molècula (com més gran és la molècula, més petit és  $\tau_c$ ). En general, molècules grans presenten espectres poc resolts degut a valors de  $T_2$  petits (entre  $10^{-5}$  i  $10^{-2}$  s), que provoquen eixamplament dels senyals.

En aquest cas també és important tenir en compte que transcorri un temps  $3 \times T_2$  abans de tornar a polsar, ja que això implica que el 95% d' $M_{xy}$  ha desaparegut. Com que  $T_2 \leq T_1$ , en general només es controla en el disseny de l'experiment que s'acompleix la condició per  $T_1$ .

- Relació senyal soroll

La relació senyal/soroll (SNR, *signal to noise ratio*) és el quocient entre la intensitat d'un senyal i la intensitat del soroll en l'espectre. Normalment la intensitat d'una sola FID és massa feble de manera que després de la transformada de Fourier la intensitat dels senyals és molt petita comparada amb la intensitat del soroll. Llavors les FIDs obtingudes després de diferents polsos es sumen i es fa la transformada de Fourier. En aquesta acumulació, el soroll és aleatori i es promitja, mentre que la contribució dels senyals és sempre positiva i per tant augmenta degut a l'addició de FIDs. La relació senyal/soroll augmenta en proporció a l'arrel quadrada del nombre d'adquisicions.

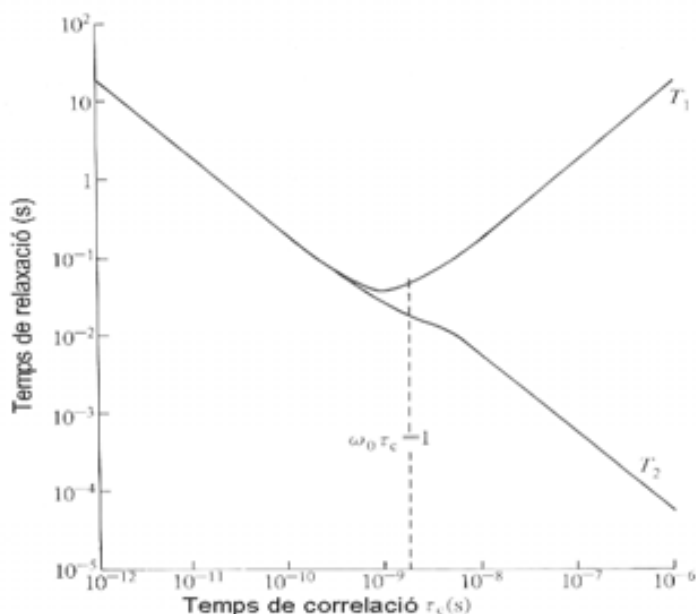


Figura 1.6: Relació entre el valor dels temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$  i el temps de correlació d'una molècula

#### 1.1.4 L'RMN bidimensional

Els espectres d'RMN convencional, és a dir, monodimensional, són representacions d'intensitat *vs.* freqüència; en els experiments bidimensionals la intensitat es representa com a funció de dues freqüències, anomenades normalment  $F_1$  i  $F_2$ . En un experiment monodimensional els acoblaments escalars donen lloc a multiplets en l'espectre. En els espectres bidimensionals, la idea de multiplet s'ha d'expandir, de manera que els multiplets consisteixen en una formació de pics individuals que donen la sensació de formar un quadrat o un rectangle. En 1D-RMN de transformada de Fourier (secció 1.1.2) el senyal es adquireix amb una funció d'una variable de temps d'adquisició i processat per transformada de Fourier per obtenir un espectre, el qual és funció d'una variable de freqüència. En els experiments bidimensionals (2D) el senyal es adquireix amb una funció de dues variables de temps,  $t_1$  i  $t_2$ , i processat per transformada de Fourier dues vegades per donar lloc a un espectre que és



Figura 1.7: Esquema general d'un experiment d'RMN bidimensional

funció de dues variables de freqüència. L'esquema general d'un experiment 2D es mostra a la figura 1.7. En el primer període, anomenat temps de preparació, la mostra és excitada per un o més polsos. La magnetització resultant evoluciona durant el primer període  $t1$ . El període que segueix és el període de mescla, que consisteix en un o més polsos. Després del període de mescla, el senyal és adquirit com a funció de la segona variable de temps,  $t2$ . La durada exacta dels temps de preparació i de mescla en la seqüència de polsos determina la informació que trobarem en l'espectre. És important remarcar que el senyal no s'adquireix durant el període  $t1$ , sino durant el període  $t2$  al final de la seqüència.

El període de mescla juga un paper crucial en la formació de l'espectre 2D. En absència d'un període de mescla, les freqüències que evolucionen durant  $t1$  i  $t2$  serien iguals i en l'espectre només apareixerien senyals en la diagonal. Per obtenir un espectre útil i interessant és essencial dissenyar la seqüència de tal manera que es produeixi transferència de senyal entre spins durant el període de mescla.

Potser el tipus d'experiment 2D més important és aquell en el què es produeix transferència de magnetització entre spins degut a l'acoblament escalar entre ells. Els experiments tipus COSY (**C**ORrelation **S**pectroscop**Y**) formen part d'aquest grup. La figura 1.8 mostra un espectre COSY esquemàtic d'una hipotètica molècula que contingui només dos  $^1\text{H}$ , A i X, que es troben acoblats. L'espectre monodimensional representat sobre l'eix  $F2$  mostra el parell de doblets esperat per aquesta molècula, centrats en els desplaçaments químics d'A i X,  $\delta_A$  i  $\delta_X$ . En un espectre COSY, les coordenades  $F1$  dels pics en l'espectre 2D corresponen també als senyals de l'espectre monodimensional i per emfasitzar aquest punt l'espectre 1D ha estat també representat en l'eix  $F1$ . Com és evident, l'espectre COSY presenta simetria al llarg de la

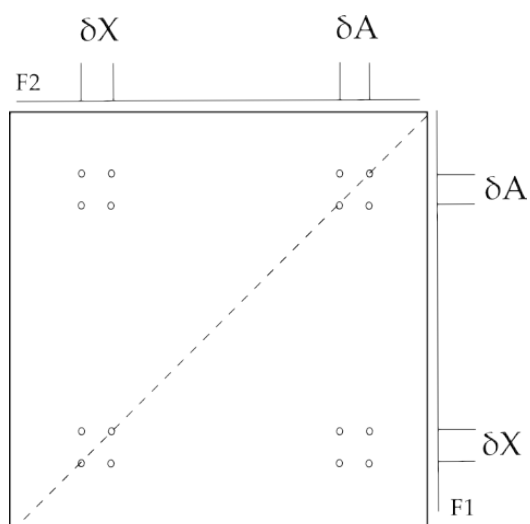


Figura 1.8: Esquema d'un espectre COSY per dos nuclis A i X acoblats

diagonal, representada per la línia discontinua (Keeler, 2004; Berger & Braun, 2004; Friebolin, 2005)

Un tipus d'experiment especialment útil consisteix en adquirir un espectre 2D on la coordenada d'un senyal en una dimensió és el desplaçament químic d'un tipus de nucli (per exemple  $^1\text{H}$ ) i la coordenada en l'altra dimensió és el desplaçament químic d'un altre nucli (per exemple  $^{13}\text{C}$ ) el qual està acoblat al primer nucli. Aquest tipus d'espectre són anomenats comunament mapes o espectres de correlació heteronuclear.

L'acoblament a un enllaç entre el  $^{13}\text{C}$  i el  $^1\text{H}$  directament unit a ell és relativament constant (al voltant de 150 Hz) i molt més gran que les constants d'acoblament a llarga distància entre  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ . Utilitzant aquesta gran diferència en les  $J$  es poden dissenyar experiments que donen lloc a espectres de desplaçaments de  $^{13}\text{C}$  *vs* desplaçaments de  $^1\text{H}$  directament units a ells. Només un tipus de nucli pot ser observat cada vegada, per tant cal escollir si s'observa  $^{13}\text{C}$  o  $^1\text{H}$  quan s'adquireix un espectre de correlació. Des del punt de vista de la sensibilitat, és molt recomanable observar  $^1\text{H}$ . En primer lloc, la magnetització del  $^1\text{H}$  és més gran que la del  $^{13}\text{C}$  ja que la separació dels nivells energètics és més gran en  $^1\text{H}$  i per tant, segons Boltzmann, la diferència de poblacions també és més gran. En segon lloc, l'abundància natural del

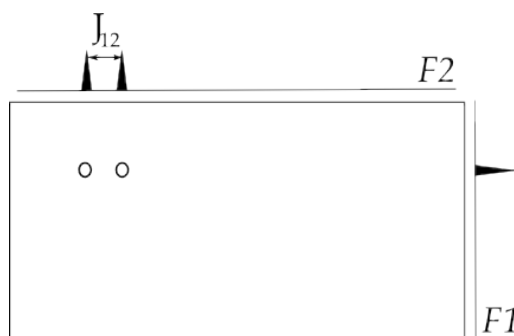


Figura 1.9: Esquema d'un espectre HMQC per dos nuclis 1 i 2 acoblats

$^{13}\text{C}$  és de l'1,1%, de manera que els enyals que provinguessin de les molècules que continguessin aquest nucli es veurien distorsionades pels senyals molt més intensos de les molècules que no el continguessin.

Un tipus concret d'espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  és **Heteronuclear multiple-quantum correlation (HMQC)**. En la figura 1.9 es mostra l'esquema de l'espectre HMQC pel cas concret d'un parell  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  acoblat. En *F2* trobem un doblet centrat en el  $\delta$  de l'spin 1 ( $^1\text{H}$ ) i aquests dos pics tenen com a coordenada en *F1* el centre del  $\delta$  de l'spin 2 ( $^{13}\text{C}$ ). En aquest experiment, la seqüència es dissenya de tal manera que els senyals provinents dels  $^1\text{H}$  no acoblats a  $^{13}\text{C}$  quedin anul·lats.

## 1.2 Aplicacions de l'RMN a l'estudi de sistemes vius

El fet que l'RMN sigui una tècnica no invasiva i no destructiva permet emprar-la en estudis *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro* de sistemes vius, tant de cèl·lules en cultiu com de biòpsies de teixit i també de teixits i òrgans dins d'un organisme intacte. Per aquestes aplicacions, hi ha dues vessants dins de la ressonància magnètica: l'espectroscòpia (MRS) i la imatgeria (MRI).

### 1.2.1 Imatgeria i espectroscòpia de ressonància magnètica

La **imatge per ressonància magnètica (MRI)** es basa en l'obtenció d'imatges a partir de la proporció d'aigua en una mostra i les seves propietats de relaxació en la regió



d'estudi. Inicialment s'emprà l'aigua degut al seu alt contingut en els teixits vius i al fet que el  $^1\text{H}$  té una alta sensibilitat de detecció. La MRI és la tècnica d'imatge d'elecció en els casos de patologies del sistema nerviós central, i s'utilitza cada cop més en patologies d'altres teixits. Proporciona un contrast excel·lent en les imatges i una molt bona resolució espacial. El contrast en els experiments de MRI s'aconsegueix principalment gràcies a les propietats dels protons de l'aigua que donen lloc als senyals, és a dir, a la densitat de protons, i als temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$  d'aquests protons. En general, es defineixen tres tipus d'imatges: ponderades en  $T_1$ , ponderades en  $T_2$  i ponderades en densitat de protons. La figura 1.10 mostra exemples d'aquests tipus d'imatges. La seqüència de polsos i els paràmetres d'imatge definiran el tipus d'imatge que s'obtindrà. També és necessari definir, mitjançant gradients de camp magnètic, una regió d'estudi, o voxel dins de la massa del teixit a estudiar (Freeman, 2003; Sijens, 2005).

Les primeres imatges d'objectes grans van ser obtingudes per Lauterbur (Lauterbur, 1973). El seu mètode implicava l'aplicació de gradients de camp magnètic per obtenir perspectives en una dimensió que després es reconstruïren per donar una imatge en dues dimensions. En els anys següents, es van proposar una gran quantitat de tècniques d'obtenció d'imatges. Es van obtenir imatges de dits (Mansfield & Maudsley, 1976) i altres parts del cos, i finalment imatges de cossos sencers, gràcies a la possibilitat d'accedir a imants de mida més gran. Posteriorment aquesta tècnica es va aplicar a l'estudi de molts sistemes diferents. El 1981 es van obtenir les primeres imatges clíniques al Hammersmith Hospital de Londres. Les millors tècniques han contribuït a que avui sigui una eina de diagnòstic clínic àmpliament utilitzada (Sijens & Oudkerk, 2005).

La necessitat d'aconseguir una major especificitat o un major contrast en alguns casos per distingir determinats canvis en les imatges van portar al desenvolupament d'agents de contrast. Aquest compostos són captats pels teixits en determinades si-

tuacions patològiques i actuen accelerant els processos de relaxació dels protons de l'aigua dels teixits a on arriben, i per tant disminueixen els temps de relaxació longitudinal ( $T_1$ ) i transversal ( $T_2$ ). L'efecte final és que l'estructura d'interès queda resolta (contrastada) de la resta d'estructures en la imatge d'MRI. Avui en dia els quelats de gadolini, com el Gd-DTPA (Gd<sup>+3</sup> i àcid dietiltriainpentacètic), constitueixen el grup més ampli de compostos paramagnètics emprats en contrast per MRI, i són considerats molt segurs en quant a risc pel pacient es refereix. El Gd-DTPA s'utilitza com a agent de contrast en els estudis clínics de rutina, tot i que altres compostos paramagnètics s'estan desenvolupant (Watanabe, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005). La figura 1.10 B mostra una imatge de cervell humà d'un pacient diagnosticat de glioblastoma obtinguda després de l'administració de Gd-DTPA.

La MRI s'empra en estudis *in vivo* i *in vitro* de sistemes model animals. La possibilitat d'obtenir animals transgènics ha permès desenvolupar encara més el coneixement de molt diverses patologies emprant aquest model (Pirko *et al.*, 2005). També s'ha aplicat en estudis *in vitro* de cèl·lules (Delikatny & Poptani, 2005; Modo *et al.*, 2005), per exemple en el seguiment de la inclusió d'ions paramagnètics en cèl·lules.

Actualment, la MRI s'ha desenvolupat fins a permetre obtenir molts tipus diferents d'informació segons el tipus d'experiment que es realitzi: angiografia, estudis de perfusió de teixits, imatges ponderades en difusió o neuroimatge funcional són algunes de les noves possibilitats que ofereix aquesta tècnica (Brown & Semelka, 1999; Hailey, 1997; Sijens, 2005).

**L'espectroscòpia de ressonància magnètica (MRS)** es basa en l'obtenció d'espectres de regions localitzades en el teixit d'estudi, generalment espectres de  $^1\text{H}$ , però també de  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{23}\text{Na}$  endògens, i de  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{17}\text{O}$  exògens. La informació que proporciona permet la caracterització de tipus bioquímics del teixit estudiat, i diferenciar dins del mateix teixit zones sanes de zones patològiques, i en alguns casos el detall obtingut permet conèixer les causes de l'alteració (Howe & Opstad, 2003).

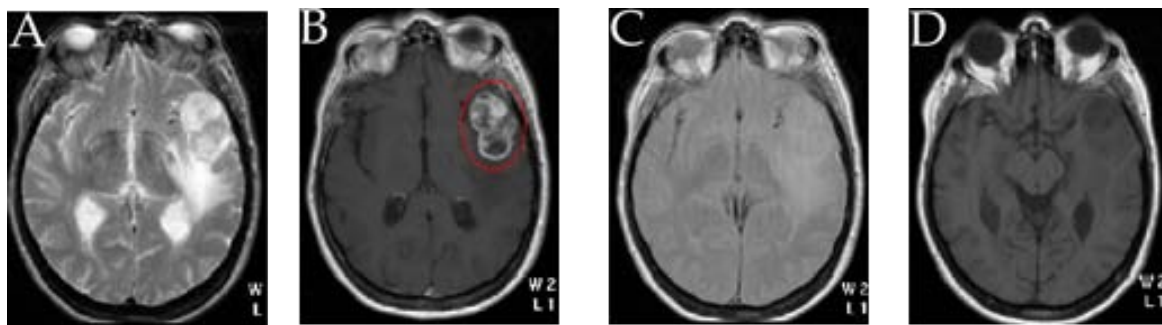


Figura 1.10: Imatge de MRI en tall axial d'un mateix pacient diagnosticat de glioblastoma, ponderades en A- $T_1$ ; B- $T_1$  després de l'administració de contrast; C- $T_2$ ; i D-densitat de protons. L'elipse vermella a B encercla la zona patològica.

El desenvolupament d'imants superconductors d'alt camp a finals dels anys seixanta i l'aplicació de la transformada de Fourier van revolucionar el panorama de l'RMN, tot i que es va trigar un temps a aplicar aquestes innovacions a l'estudi de sistemes vius. El 1973, Moon i Richards (Moon & Richards, 1973) van descriure estudis d'RMN d'alta resolució de  $^{31}\text{P}$  d'eritròcits, on havien detectat ATP, fosfat inorgànic i 2,3-fosfoglicerat, i havien pogut mesurar el pH intracel·lular. També es va emprar  $^{31}\text{P}$ -RMN en l'estudi de Hoult (Hoult *et al.*, 1974) de múscul de pota de rata. Es van assignar senyals de diversos compostos del metabolisme energètic i es va mesurar el pH intracel·lular. Aquests i altres estudis posteriors van mostrar l'interès que tenia l'RMN de  $^{31}\text{P}$  com a sensor no invasiu del metabolisme energètic tissular.

Alhora, es va comprovar que l'RMN de  $^{13}\text{C}$  es podia emprar per seguir els productes intermedis de les rutes metabòliques (Eakin *et al.*, 1972; Sequin & Scott, 1974). Més tard, també es descrigué l'ús d'RMN de  $^1\text{H}$  per observar un ampli nombre de compostos en eritròcits en suspensió (Brown *et al.*, 1977). El 1980 es va desenvolupar la primera bobina de superfície, que, col·locada propera a la regió d'interès permetia l'estudi del múscul esquelètic i metabolisme cerebral de petits animals (Ackerman *et al.*, 1980). Aquesta pràctica es va estendre posteriorment a estudis en humans (Ross *et al.*, 1981; Cady *et al.*, 1983). Els primers espectres de teixits cancerosos humans es van aconseguir el 1983 (Griffiths *et al.*, 1983), concretament en un estudi de

$^{31}\text{P}$  d'un sarcoma en una mà.

L'MRS permet un estudi de tipus bioquímic dels teixits a estudiar. En el cas d'aplicar-se a l'estudi *in vivo* d'un organisme, és també necessari definir un vòxel sobre el qual s'obtidran els espectres. En el cas d'humans, en l'actualitat la majoria dels aparells clínics de MRI permeten l'obtenció en la mateixa exploració de la imatge i de l'espectre. Entre d'altres, la MRS permet obtenir informació sobre el pH intra i extracel·lular de la regió d'estudi, mesures d'ions metàlics implicats en reaccions biològiques, mesures cinètiques i de concentració de metabòlits i obtenció d'informació d'heterogeneïtat cel·lular i tissular, així com informació fisiològica mitjançant experiments de perfusió, difusió i mesures de flux (Gadian, 1995). Les limitacions que presenta estan lligades a la seva baixa sensibilitat, que implica la necessitat d'altres concentracions del metabòlit a estudiar (entre 100nM i 1mM per estudis de  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$  en abundància natural i  $^{13}\text{C}$  per compostos marcats) per poder obtenir una SNR acceptable.

La MRS es pot aplicar també a l'estudi *ex vivo* de biòpsies, les quals són de vegades obtingudes del teixit a estudiar per realitzar un estudi histopatològic. L'obtenció d'espectres d'RMN d'aquestes mostres pot proporcionar molta informació de tipus bioquímic sobre el teixit. La dificultat de treballar amb biòpsies és introduir-la en un tub d'RMN i poder obtenir un espectre d'alta qualitat, i la isquèmia que pateix el teixit, que pot distorsionar els resultats. Inicialment s'obtenia un extracte àcid de les biòpsies, i s'adquirien els espectres de l'extracte de metabòlits desproteïnitat que ja tenia un patró espectral estable (Maxwell *et al.*, 1998). Actualment, la utilització de l'espectroscòpia d'alta resolució de gir d'angle màgic (*high-resolution magic angle spinning spectroscopy*, HR-MAS) ha permès obtenir espectres de  $^1\text{H}$ -RMN detallats del patró metabòlic de biòpsies intactes (Barton *et al.*, 1999; Howe & Opstad, 2003). A més, la informació que s'obté és més comparable amb els espectres *in vivo* (Cheng *et al.*, 1998), que els extractes àcids, ja que ens aquests la informació deguda a la

major part de macromolècules i lípids es perd en el procés d'extracció àcida.

L'MRS s'aplica també a l'estudi de cèl·lules intactes (Reckel *et al.*, 2005) i de sistemes model animals (Pirko *et al.*, 2005) amb l'objectiu de millorar el coneixement dels processos que es donen *in vivo* en les diverses patologies d'estudi.

Tant la imatgeria de ressonància magnètica (MRI) com l'espectroscòpia de ressonància magnètica (MRS) s'empren en l'actualitat en el diagnòstic i pronòstic mèdic de moltes patologies, com per exemple tumors, esclerosi múltiple, síndromes coronaris o epilèpsia.

### 1.2.2 L'RMN en l'estudi del càncer. Els tumors cerebrals.

La ressonància magnètica presenta un ampli rang de sensibilitats, i per tant ha estat usada comunament per estudiar el càncer en humans, mitjançant tant MRI com MRS (Sorensen, 2006). Actualment, les dues tècniques, MRI i MRS s'utilitzen en el diagnòstic de tumors, i en general de manera no excloent (Gruber *et al.*, 2005).

Una de les patologies canceroses més àmpliament estudiades per RMN, tant en la seva vessant d'imatge (MRI) com en l'espectroscòpia (MRS), són els tumors cerebrals. El cervell presenta certs avantatges respecte d'altres òrgans: primer, degut a la seva relativa immobilitat comparada, per exemple, amb el cor, de manera que els voxels es poden definir més acuradament i el moviment global pot ser corregit per processament postadquisició; segon, degut a la seva forma aproximadament esfèrica i homogeneïtat intrínseca, que permet ajustar el camp magnètic per aconseguir una bona homogeneïtat. Això ha fet que es possessin a punt en cervell estudis, principalment de  $^1\text{H}$ -RMN, que s'han traslladat, posteriorment, a l'estudi d'altres òrgans i teixits.

La MRI s'utilitza àmpliament en l'actualitat per l'estudi de diferents tipus de tumor. La informació principal que proporciona la MRI és de tipus espacial (anatómica i morfològica), i per tant permet detectar una massa anòmla en el teixit

estudiat, determinar quin tipus de patologia representa, i realitzar un seguiment de la seva evolució, especialment després que el pacient rebi tractament (Baudendistel *et al.*, 2004). Tot i així, les tècniques d'imatge més avançades, com per exemple difusió o angiografia, proporcionen també informació de tipus fisiològic. La possibilitat d'emprar models animals i el desenvolupament d'imants per estudis de recerca de més alt camp (per exemple 7T) que els que s'empren en clínica (1,5 o 3T generalment) està permetent un avanç important en el desenvolupament de noves aplicacions de la MRI (Balaban & Hampshire, 2001). Per una revisió de la MRI aplicada a l'estudi de cervell es pot consultar Atlas (Atlas, 1991).

La MRS s'ha emprat durant més de 20 anys per conèixer distribucions de metabòlits en cèl·lules i teixits. S'han desenvolupat tècniques que permeten l'obtenció de múltiples espectres simultàniament amb elements de volum tant petits com  $1 \text{ mm}^3$  (Sijens & Oudkerk, 2005). Permet la diferenciació entre diferents tipus de tumors i també, en un ampli rang de casos, la possibilitat de diferenciar entre graus de malignitat, graus del tumor i prognosis. També permet el seguiment de la resposta d'un tumor a diferents tractaments. Això és degut principalment a la caracterització del patró espectral del teixit sà i del tumor, i la seva comparació per caracteritzar-ne les diferències. La interpretació bioquímica dels espectres obtinguts *in vivo* s'ha vist facilitada per la comparació amb espectres d'alta resolució de cèl·lules en cultiu o biopsies (Howe & Opstad, 2003). La figura 1.11 mostra espectres promig de tumors cerebrals humans, concretament glioblastoma, que poden ser emprats en la diferenciació de tipus tumorals.

Actualment està guanyant molt de pes l'estudi de metabòlits detectables no només per  $^1\text{H}$ , sino per  $^{31}\text{P}$ , ja que proporcionen molta informació sobre el metabolisme energètic del tumor (Gillies & Morse, 2005) i s'ha comprovat que en molts tipus de tumor el metabolisme de fosfolípids es troba alterat (Podo, 1999). D'especial rellevància és el cas de la colina i el seu metabolisme, que tenen relació amb una gran

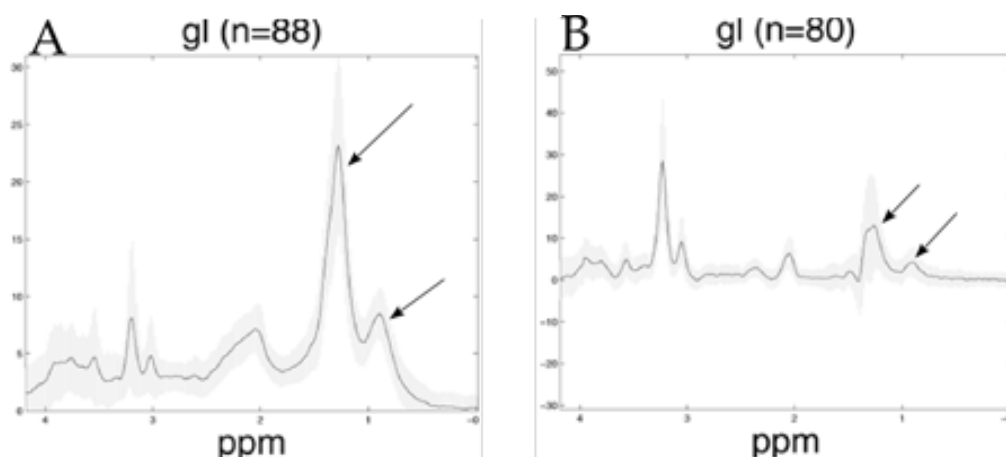


Figura 1.11: Espectres promig de glioblastoma obtinguts de la base de dades INTERPRET (<http://azizu.uab.es/INTERPRET/>) i Julià-Sapé i col·laboradors (Julià-Sapé *et al.*, 2006). A-temps eco llarg (136 ms), B-temps d'eco curt (30 ms). Les fletxes indiquen els senyals de lípids mòbils a 1,3 i 0,9 ppm.

quantitat de processos en tumors. Recentment, s'ha descrit un augment en l'activitat colina quinasa en cèl·lules tumorals en cultiu (Ramírez de Molina *et al.*, 2002a) i en tumors humans *in vivo* (Ramírez de Molina *et al.*, 2002b) en comparació amb els teixits normals, que porta a un augment en la capacitat de síntesi de fosfocolina. Aquests resultats podrien indicar un paper de la colina quinasa en transformacions tumorals i carcinogènesi.

Ha contribuït de manera molt significativa a la millora del diagnòstic de tumors per RMN els mètodes de caracterització per anàlisi estadística dels espectres (Majós *et al.*, 2002), anàlisi lineal discriminant (Tate *et al.*, 2003) o xarxes neurals (Poptani *et al.*, 1999). El treball amb reconeixement de patrons i les bases de dades multicèntriques estan permetent avançar molt en la millora del diagnòstic i pronòstic de tumors cerebrals (Tate *et al.*, 1998).

### 1.3 Lípids mòbils i gotícules lipídiques

Una de les possibles aproximacions a l'estudi de tumors en general i de tumors cerebrals en particular és la caracterització qualitativa i quantitativa del patró espectral

del teixit d'estudi, i la utilització d'aquesta informació per comparar-la amb altres tipus de teixits, ja siguin d'altres tumors o patologies, o sans. En el cas dels tumors cerebrals, la caracterització del patró espectral d'RMN de  $^1\text{H}$  ha permès detectar en el patró espectral d'alguns tumors agressius (glioblastomes i metàstasis) (Posse *et al.*, 1993; Preul *et al.*, 1996; Negendank & Sauter, 1996; Tate *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2003) un senyal que podria resultar d'interès en la diferenciació de tipus tumorsals i en la caracterització de la seva proliferació i agressivitat: el senyal de lípids mòbils. Aquest senyal ha estat detectat en tumors agressius, relacionat amb processos de necrosi (Rémy *et al.*, 1997; Howe & Opstad, 2003) i en línies cel·lulars en cultiu (Hakumaki & Kauppinen, 2000), relacionats amb proliferació cel·lular (Barba *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2002) i apoptosi (Al-Saffar *et al.*, 2002), entre d'altres.

Els senyals de lípids mòbils (ML) foren estudiats per primera vegada el 1982, per Mountford i col·laboradors (Mountford *et al.*, 1982). Van descriure la presència de senyals a 0,9 i 1,2 ppm en l'espectre d'RMN de  $^1\text{H}$  de limfòcits, limfoblasts de leucèmia i de limfòcits transformats amb agents mitòtics. Els senyals de lípids mòbils eren més intensos en les cèl·lules transformades. Sugerien que els senyals provenien de lípids de membrana i que els canvis en la seva intensitat podien estar relacionats amb la transformació de les cèl·lules de manera que proposaven que podrien ser emprats com a indicadors de malignitat tumoral. A partir d'aquí es va obrir un camí de gran interès per caracteritzar l'origen bioquímic i metabòlic d'aquests senyals, ja que permetria poder comprendre millor els processos tumorsals *in vivo*.

Molts sistemes cel·lulars, no només teixits apoptòtics o necròtics, presenten senyals de ML en el seu patró espectral, i en ells s'observen variacions en la intensitat relativa del senyal de ML (Barba *et al.*, 1999; Hakumaki & Kauppinen, 2000). Conèixer l'origen de les variacions dels ML podria proporcionar informació sobre l'origen dels ML en tumors *in vivo* i sobre la seva relació amb la bioquímica tumo-



ral. Entendre l'origen cel·lular d'aquests ML i dels seus canvis podria ser rellevant per permetre que l'RMN pugui assolir tot el seu potencial en el diagnòstic, pronòstic i planificació de les teràpies en tumors cerebrals (Murphy *et al.*, 2003; Howe & Opstad, 2003)

### 1.3.1 Localització subcel·lular dels lípids que originen els senyals de ML

A partir de la primera detecció per RMN de  $^1\text{H}$  *ex vivo* dels ML, la localització del compartiment subcel·lular que els origina ha estat molt discutida. S'han proposat dues possibilitats: una localització citosòlica i una localització a membrana plasmàtica.

Mountford i col·laboradors van mantenir la hipòtesi d'una **localització a membrana plasmàtica dels dominis lipídics que donen origen als ML**. En l'estudi d'RMN de  $^1\text{H}$  de limfòcits, limfoblasts de leucèmia i de limfòcits transformats amb agents mitòtics publicat el 1982 (Mountford *et al.*, 1982) conclouien que el lloc on es localitzen els dominis que generen els ML es troba a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, i no al citosol, degut a que la incubació de les cèl·lules amb  $\text{Gd}^{+3}$ , que no entraria dins la cèl·lula, provocava un eixamplament dels senyals d'àcids grassos dels lípids de membrana, concretament dels fosfolípids de la cara externa de la bicapa, mentre que la incubació amb  $\text{Mn}^{+2}$ , que si entraria dins les cèl·lules, provocava un eixamplament de tots els senyals de l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN de manera no selectiva. Aquests resultats no tenen en compte que un percentatge del  $\text{Gd}^{+3}$  pot entrar dins les cèl·lules (Stasio *et al.*, 2001), de manera que podria provocar la desaparició d'una part dels senyals de lípids que s'originaria en les gotícules lipídiques.

El 1984 Mountford i col·laboradors (Mountford *et al.*, 1984) van publicar un article on estudien cèl·lules canceroses metastàtiques per RMN. Els autors estudiaren els canvis en els lípids de la membrana plasmàtica de dues línies cel·lulars malignes,

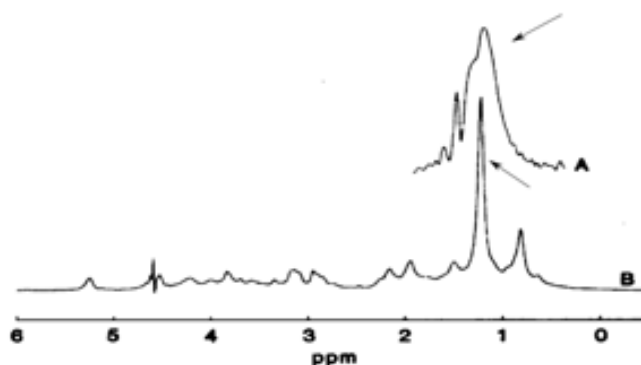


Figura 1.12: Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN de cèl·lules de la línia de carcinoma de mama 13762. A- ampliació de l'espectre amb *line broadening* de 3Hz; B- resolució millorada amb l'aplicació d'una funció Lorentziana- Gaussiana a l'espectre. El senyal que es marca amb la fletxa correspondria als lípids mòbils. Imatge modificada de Mountford i col·laboradors (Mountford *et al.*, 1984)

i els relacionaven amb la capacitat metastàtica de les cèl·lules. Mesuraren els temps de relaxació del senyal a 1,2 ppm, i hi aplicaren tècniques de millora de la resolució. Observaren que el pic es podia descomposar en quatre senyals, cadascun dels quals presentava un comportament biexponencial amb components  $T_2$  de 20 i 150 ms, en cèl·lules no metastàtiques. En les cèl·lules metastàtiques les components de  $T_2$  eren tres, de 20, 100 i 800 ms. A la figura 1.12 es mostra l'espectre de les cèl·lules 13762 de carcinoma de mama estudiades. Els autors assignen els senyals a èsters de colesterol i en menor mesura a triacilglicerols, que estarien formant part de dominis de membrana, i involucrats en els canvis de fase de les membranes. No es fa referència a la presència en la regió d'estudi d'altres compostos amb  $T_2$  llarg, com el doblet del lactat que apareix centrat a 1,35 ppm i podria contribuir al senyal.

El 1985 el mateix grup va publicar un article on comparaven el suposat domini intramembrana amb els diferents tipus de lipoproteïnes (Williams *et al.*, 1985) per intentar trobar un model per l'estudi del domini intramembrana, i conclouien que els quilomicrons i les VLDL eren molt similars als dominis intramembrana, ja que en els tres casos no s'observava bescanvi dels lípids per difusió entre partícules i el contingut principal era de lípids neutres. El 1986 descriuen que un complex proteolipídic

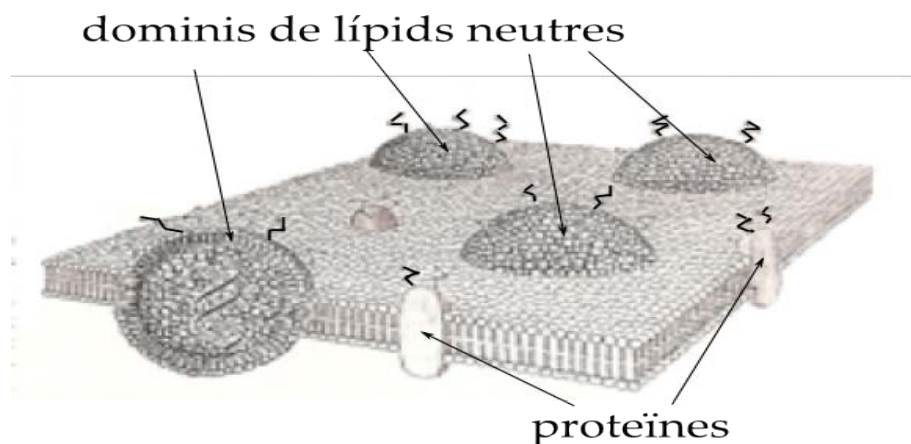


Figura 1.13: Model de domini lipídic intramembrana proposat per Mountford i col·laboradors (Mountford & Wright, 1988). La figura mostra un fragment de membrana plasmàtica, on es trobarien intercalats entre els fosfolípids els dominis de lípids neutres. Es mostra un d'aquests dominis obert en secció, i en el seu interior conté triacilglicerols i podria contenir DNA. Les estructures en forma d'antena serien carbohidrats

aïllat del sèrum d'una pacient amb càncer d'ovari, proporciona un espectre de  $^1\text{H}$ -RMN que podria explicar les anormalitats detectades en els espectres de cèl·lules tumorals, i.e. que seria l'origen dels senyals de lípids mòbils (Wright *et al.*, 1986). Aquest mateix any (May *et al.*, 1986) estudien per espectroscòpia d'RMN bidimensional de correlació escalar (COSY) diferents línies cel·lulars i conclouen que els senyal lipídic a 1,26 ppm prové de dominis de lípids neutres (triacilglicerols, diacilglicerols i èsters de colesterol) en la membrana plasmàtica. Aquests lípids neutres tindrien moviment isotròpic i no serien bescanviables per difusió amb altres lípids de la membrana plasmàtica. El 1988, Mountford i Wright (Mountford & Wright, 1988) descriuen un nou model per l'organització dels lípids en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules malignes, basant-se en la informació recollida en el seu grup en els darrers anys (figura 1.13).

Altres grups han recolzat també la hipòtesi de la localització membranar. LeMoyec i col·laboradors (Moyec *et al.*, 1996) van observar que la intensitat dels senyals de lípids mòbils presents en els espectres de  $^1\text{H}$  de la línia cel·lular de leucèmia K562 eren diferents en el cas de les cèl·lules sensibles al tractament amb la

droga adriamicina (K562wt) i les seves homòlogues resistents a aquest tractament (K562adr), sent major la intensitat de la ressonància del grup metilè dels ML en les cèl·lules sensibles que en les resistents a la droga. També van observar que quan la resistència de les cèl·lules K562adr es revertia pel seu cultiu en un medi sense la droga o per tractament amb el compost verapamil, la intensitat dels senyals de ML augmentava respecte a l'homòloga resistent. Els autors conclouien que els lípids tenien un paper important en la resistència als fàrmacs. En un treball posterior, Le-Moyec i col·laboradors (Moyec *et al.*, 1997) van utilitzar la tinció de lípids amb el colorant *Nile Red* per a determinar si havia una correlació entre la quantitat de gotícules lipídiques presents en el citoplasma i les diferències espectrals observades entre els diferents tipus de cèl·lules K562. En aquest cas, van observar una discrepància entre els resultats obtinguts mitjançant tinció de les gotícules i la intensitat dels senyals de ML, que segons ells indicava que podien haver-hi altres estructures lipídiques diferents de les gotícules que contribuïssin als senyals de ML (com els dominis intramembrana proposats per Mountford). Una possible explicació per a aquesta discrepància és que contessin com cèl·lules amb gotícules aquelles cèl·lules en les quals el colorant va tenyir estructures subcel·lulars com el reticle endoplasmàtic, però no gotícules.

S'ha observat que en neutròfils aïllats de pacients amb infeccions bacterianes o estimulats *in vivo* amb LPS (lipopolisacàrid, que és el component majoritari del *cell wall* dels bacteris gram-negatius i que actua com endotoxina) presentaven un espectre d'RMN de  $^1\text{H}$  dominat per senyals de ML (May *et al.*, 1997). També es van observar senyals de lípids mòbils en membranes plasmàtiques purificades de neutròfils tractats amb LPS, però no en les purificades de neutròfils control. L'anàlisi química de les primeres va mostrar que aquestes contenien el doble de TG que les membranes dels neutròfils sense tractar. Segons els autors, tots aquestes dades confirmaven que la ressonància de lípids mòbils provenia de la membrana i no de gotícules li-

pídiques en el citoplasma. També van descartar una possible contaminació de les fraccions de membrana purificada amb gotícules lipídiques citoplasmàtiques. Segons ells, perquè això últim succeís seria necessària algun tipus d'interacció feble de les gotícules amb el costat citoplasmàtic de la membrana, interacció que no resistiria el procés de purificació.

En un treball més recent, Wright i col·laboradors (Wright *et al.*, 2000) han observat que neutròfils cultivats amb sèrum humà que conté alts nivells d'àcids grassos lliures (en una concentració similar a la trobada en els llocs d'inflamació) presentaven un espectre de  $^1\text{H}$  amb intenses senyals de lípids mòbils, sent molt major la intensitat dels senyals de ML en aquest últim cas que amb el tractament amb LPS. Desafortunadament, aquests dos treballs no han tingut en compte una possible contribució de les gotícules lipídiques citoplasmàtiques als senyals de ML, sobretot considerant que hi ha estudis anteriors en els quals s'ha descrit la presència de gotícules lipídiques citoplasmàtiques no unides a membrana en neutròfils (Weller *et al.*, 1989; Weller *et al.*, 1991). Segons Weller i col·laboradors, els neutròfils presentaven poques gotícules lipídiques (0,7 per cèl·lula) en condicions normals, mentre que el seu nombre i grandària augmentava quan els neutròfils intervenien en processos inflamatoris.

Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 2003) van suggerir que el senyals de lípids mòbils detectat en els espectres de cèl·lules hematopoiètiques K562 podien provenir, com a mínim parcialment, de dominis de membrana que no eren extrets de les cèl·lules per tractament amb detergent. La fixació de les cèl·lules amb paraformaldehid i el posterior tractament amb el detergent Triton X-100 a  $4^\circ\text{C}$  permetia observar en l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN de les cèl·lules fixades senyal de lípids mòbils, menys intensos que en els cèl·lules intactes, però igualment significatius. En principi, el Triton X-100 extrauria els lípids de les cèl·lules, excepte aquells que hi fossin resistents, com els dominis units a la membrana. Per assegurar que els senyals pro-

venien de dominis de membrana, van realitzar experiments similars als de Mountford i col·laboradors (Mountford *et al.*, 1982) amb  $Gd^{+3}$ , i van concloure que l'efecte d'eixamplament dels senyals de ML provocat per l'ió paramagnètic indicaven una localització d'aquests dominis a la membrana plasmàtica.

També Wright i col·laboradors (Wright *et al.*, 2003) han descrit la contribució al senyal de ML de fraccions de membrana plasmàtica resistents a detergents, anomenades *plasma membrane domains* o DRMs. En aquest cas, l'estudi de fraccions de membranes plasmàtiques de cèl·lules Jurkat i CEM-T4 obtingudes per tractament amb Triton X-100 i gradient de sacarosa mostraven que existien dominis de membrana resistents a detergents que presentaven senyals de ML en el seu espectre de  $^1H$ -RMN. També es van aïllar gotícules lipídiques en el procés de separació de la fracció citosòlica de la de membrana plasmàtica per tractament amb Triton X-100 i gradient de sacarosa, que donaven lloc a un espectre de  $^1H$ -RMN característic de ML. De tota manera, la separació de diferents fraccions lipídiques, no pot assegurar l'origen de les gotícules lipídiques aïllades (citosol, reticle endoplàsmic, Golgi, unides a citoesquelet?) i també és possible que el tractament amb detergents provoqui modificacions en l'estructura original dels lípids que donen lloc als senyals de lípids mòbils. Cal destacar també que dels grups que afirmen l'existència de dominis de membrana només Mountford (Mountford *et al.*, 1982) ha comprovat per altres tècniques (concretament tinció amb Sudan Black VI) l'absència de gotícules lipídiques citosòliques en les cèl·lules estudiades. Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 2003) i Wright i col·laboradors (Wright *et al.*, 2003) no han comprovat per tècniques òptiques (p.e. microscòpia de fluorescència o de transmissió) l'existència de gotícules lipídiques citosòliques en els respectius sistemes d'estudi.

La hipòtesi més acceptada avui en dia és que **els ML semblen tenir el seu origen en cadenes d'àcids grassos de molècules de triacilglicerol (TAG) continguts en gotícules lipídiques citosòliques (1-2 micrometres de diàmetre) en cèl·lules**

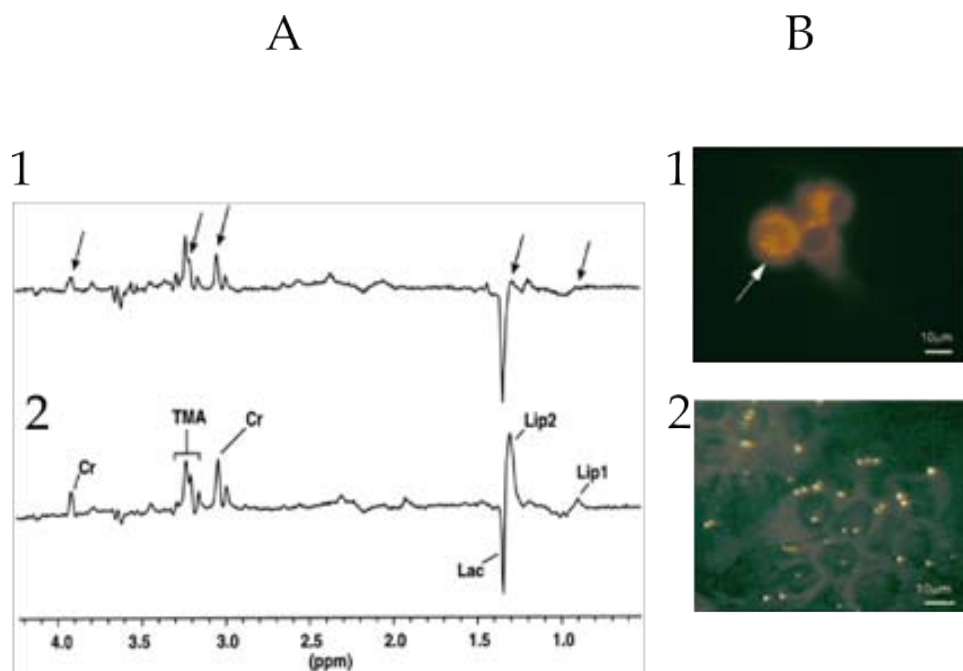


Figura 1.14: Espectres de 1D-<sup>1</sup>H-RMN a 136 ms de temps d'eco de cèl·lules C6 (A) i imatges de microscòpia òptica de fluorescència de cèl·lules C6 tenyides amb *Nile Red* (B). 1-cèl·lules en fase exponencial; 2-cèl·lules en fase post-confluent (Barba *et al.*, 1999).

**intactes.** Les gotícules lipídiques han estat detectades per tècniques òptiques en sistemes cel·lulars diversos. En cèl·lules en cultiu, Barba i col·laboradors (Barba *et al.*, 1999) van mostrar la presència de gotícules lipídiques citosòliques en cèl·lules C6 de glioma de rata en fase de densitat de saturació, mitjançant tinció amb el colorant *Nile Red*. L'aparició de gotícules correlacionava amb una major intensitat dels senyals a 0.9 i 1.24 ppm en l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN. Per altra banda, les cèl·lules en fase exponencial no presentaven pràcticament gotícules citosòliques per tinció amb *Nile Red*, i els senyals de ML no eren visibles. La figura 1.14 mostra els espectres d'<sup>1</sup>H-RMN i les imatges de microscòpia òptica de les cèl·lules C6 estudiades en aquell article. Pérez i col·laboradors (Pérez *et al.*, 2002) van mesurar per RMN de difusió la mida del compartiment subcel·lular que contenia els ML en cèl·lules C6, i van determinar que la seva mida (1-2 μm) no diferia significativament de la mida de les gotícules lipídiques citosòliques presents en aquestes cèl·lules detectades per tinció amb *Nile Red* i visualització per microscòpia òptica.

Així mateix, els ML han estat detectats *in vivo* en models animals (Rémy *et al.*, 1997; Hakumaki *et al.*, 1999; Lahrech *et al.*, 2001) i en biòpsies de tumors humans (Kepes & Rubinstein, 1981; Martínez-Pérez *et al.*, 1996). Rémy i col·laboradors (Rémy *et al.*, 1997) van realitzar un estudi sobre l'origen dels ML en gliomes de cervell de rata induïts amb cèl·lules C6, mitjançant estudis de  $^1\text{H}$ -RMN i microscòpia electrònica de transmissió. En aquest cas, es detectaven senyals de ML en totes les mostres de glioma *ex vivo*, i no es detectaven en les mostres de cervell sà. En els estudis per microscòpia de transmissió, es van detectar gotícules lipídiques citosòliques, més abundants en les cèl·lules més properes al centre necròtic del tumor. A més, els experiments d'RMN de difusió *in vivo* mostraren que el senyal de ML en aquell cas provenia de gotícules lipídiques de mida gran ( $8,2 \mu\text{m}$  de diàmetre promig) en el glioma de cèl·lules C6. Per tant, conclouen que en el model de glioma de cèl·lules C6 els senyals de ML provenien majoritàriament de gotícules lipídiques, probablement associades a processos de necrosi.

Lahrech i col·laboradors (Lahrech *et al.*, 2001) van realitzar també estudis sobre gotícules lipídiques en el model de glioma intracraneal de rata. Van realitzar experiments d'RMN de difusió *in vivo* amb rates a les quals se'ls havia implantat cèl·lules C6 per induir un tumor. Es van realitzar estudis de microscòpia de fluorescència i de contrast de fases de talls dels tumors extrets de rates. Els experiments d'RMN van mostrar que la mida de les estructures que generaven els senyals de ML correlacionava amb la mida de les gotícules lipídiques que s'observaven per microscòpia, i van concloure que els senyals de ML provenien en aquest cas de gotícules lipídiques, de diàmetre promig  $4,27 \pm \mu\text{m } 0,71$ , arribant a trobar gotícules extracel·lulars de  $10 \mu\text{m}$  de diàmetre en focus necròtics de tumors .

Martínez-Pérez i col·laboradors (Martínez-Pérez *et al.*, 1996) van analitzar per microscòpia electrònica les biòpsies d'alguns tumors cerebrals humans (3 glioblastomes, 4 metàstasis, 1 limfoma i 1 meningioma) que presentaven senyals lipídics en



l'espectre de  $^1\text{H}$  *in vivo*, observant-se la presència de gotícules lipídiques en totes les mostres i calculant-se un diàmetre promig d'  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . En aquelles mostres que no presentaven necrosi només es van observar gotícules intracel·lulars, mentre que en les que sí presentaven necrosi es van observar tant gotícules extra- com intra-cel·lulars. En el cas de les metàstasis es van analitzar biòpsies procedents tant del centre com del marge del tumor, observant-se que les gotícules s'acumulaven preferentment en la regió central del tumor que presentava necrosi. També s'han observat la presència de gotícules lipídiques citoplasmàtiques en cèl·lules necròtiques o en procés de degeneració i en macròfags de biòpsies de càncers colorectals (Ende *et al.*, 1996).

Una correcta interpretació de la detecció de ML en tumors cerebrals *in vivo* i els seus possibles canvis deguts a la progressió (Murphy *et al.*, 2003) requeriran entendre correctament la localització subcel·lular dels lípids que originen els ML.

### 1.3.2 Origen metabòlic dels lípids que originen els senyals de ML

L'origen metabòlic dels ML no s'ha establert amb exactitud. A més, la intensitat dels senyals de ML canvia, degut a diferents situacions cel·lulars (recollides a (Hakumaki & Kauppinen, 2000)), i les raons i significats d'aquest canvis no s'han comprès completament.

Els ML s'han relacionat amb **necrosi**, en estudis *in vivo* i *ex vivo*. Kuesel i col·laboradors ha mostrat la presència de senyals de ML en àrees necròtiques de diversos tipus de tumors cerebrals humans estudiats *ex vivo* per  $^1\text{H}$ -RMN (Kuesel *et al.*, 1994a) i també en zones no necròtiques dels tumors (Kuesel *et al.*, 1994b). Aquesta darrera dada indicaria un possible origen no necròtic dels ML o un *core* necròtic no visible en les mostres per anatomia patològica convencional. Zoula i col·laboradors han descrit la presència de senyals de ML en àrees necròtiques de tumors cerebrals en models de glioma de cèl·lules C6 en rata (Zoula *et al.*, 2003a). Es van obtenir imatges

i espectres *in vivo* dels tumors i es van estudiar un cop sacrificats els animals per microscòpia de contrast de fases i de fluorescència. La presència de gotícules zones necròtiques en els estudis histològics de cervell correlacionava amb l'aparició de senyals de ML *in vivo*. El mateix grup ha descrit també la presència dels senyals en zones hipòxiques envoltant les zones de necrosi (Zoula *et al.*, 2003b). En aquest cas, es van estudiar les cèl·lules que envoltaven les zones necròtiques i es va comprovar en les cèl·lules hipòxiques envoltant aquestes zones la presència de gotícules lipídiques intracel·lulars. Aquest resultat suggereixen una possible relació entre ML i hipòxia severa propera a àrees necròtiques.

Estudis *ex vivo* duts a terme amb cultius cel·lulars han mostrat també senyals de ML en cèl·lules tractades amb agents citotòxics. En aquest sentit, Delikatny i col·laboradors han descrit un augment en els senyals de ML després de tractaments amb agents citotòxics en cèl·lules de càncer de mama humana de la línia DU4475 (Delikatny *et al.*, 1996b). Roman i col·laboradors (Roman *et al.*, 1997) van mostrar que al tractar cèl·lules mamàries humanes transformades no malignes amb el compost citostàtic clorur de tetrafenilfosfoni (TPP), el qual inhibeix la proliferació cel·lular, es produïa un augment significatiu del senyal de lípids mòbils en l'espectre d'RMN de  $^1\text{H}$ , augment que depenia de les dosis de TPP i del temps d'incubació. També Delikatny i col·laboradors (Delikatny *et al.*, 2002) va descriure un augment en els senyals de ML i aparició de gotícules lipídiques després del tractament amb agents citotòxics en cèl·lules de la línia HBL-100 de càncer de mama humana, que eren dependents del temps i la concentració del fàrmac. Aquests resultats semblaven indicar un potencial rol del catabolisme lipídic lisosomal en la formació de lípids visibles per RMN en models de dany citotòxic.

Diferents grups han correlacionat **l'augment en ML amb la presència de gotícules lipídiques després de la inducció d'apoptosi**. En el treball realitzat per Blankenberg i col·laboradors (Blankenberg *et al.*, 1997) s'ha descrit que la inducció

d'apoptosis en cèl·lules Jurkat-T mitjançant un agent quimioterapèutic anava acompanyada per l'augment de la intensitat de la ressonància del grup metilè a 1.26 ppm observada en l'espectre de  $^1\text{H}$ .

Hakumaki i col·laboradors (Hakumaki *et al.*, 1999) van detectar en gliomes de rata que desenvolupaven apoptosi per tractament amb ganciclovir degut a tractaments de teràpia gènica l'acumulació de lípids, especialment d'àcids grassos poliinsaturats ressonant a 2.8 i 5.3 ppm en  $^1\text{H}$ -RMN, i gotícules lipídiques (detectades per microscòpia de transmissió). Els autors suggerien que l'acumulació de lípids pot ser emprada com a marcador d'aturada del creixement tumoral i detecció precoç de la resposta a teràpia d'un tumor *in vivo*. Suggereixen també que l'origen dels àcids grassos que donen lloc als ML observats podria ser els fosfolípids de membrana, per acció de la fosfolipasa A 2 sobre fosfatidilcolina.

Al-Saffar i col·laboradors van descriure la relació entre apoptosi i l'acumulació de triacilglicerols en cèl·lules Jurkat (Al-Saffar *et al.*, 2002). Les cèl·lules estudiades per microscòpia confocal presentaven gotícules lipídiques citosòliques i l'estudi dels extractes cel·lulars mostraren un augment en el contingut de triacilglicerols en les cèl·lules en donar-se l'apoptosi. El grup de Delikatny (Milkevitch *et al.*, 2005) també va mostrar l'augment en el senyal de lípids mòbils en cèl·lules de càncer de pròstata que desenvolupaven apoptosi per inducció amb diversos fàrmacs (figura 1.15). Iorio i col·laboradors (Iorio *et al.*, 2003) varen descriure que la inhibició de l'enzim acil-CoA sintetasa amb triacsina C provoca una inhibició de l'aparició de senyals de ML i gotícules lipídiques en cèl·lules HuT 78 a les quals s'induïa apoptosi. Aquests resultats suggeririen que els triacilglicerols continguts en gotícules lipídiques en cèl·lules HuT 78 apoptòtiques eren sintetitzats d'acil-CoA obtinguts com a mínim parcialment a partir de reservoris cel·lulars endògens preexistents d'àcids grassos.

Per altra banda, Podo i col·laboradors (Podo *et al.*, 1996) i Nadal i col·laboradors

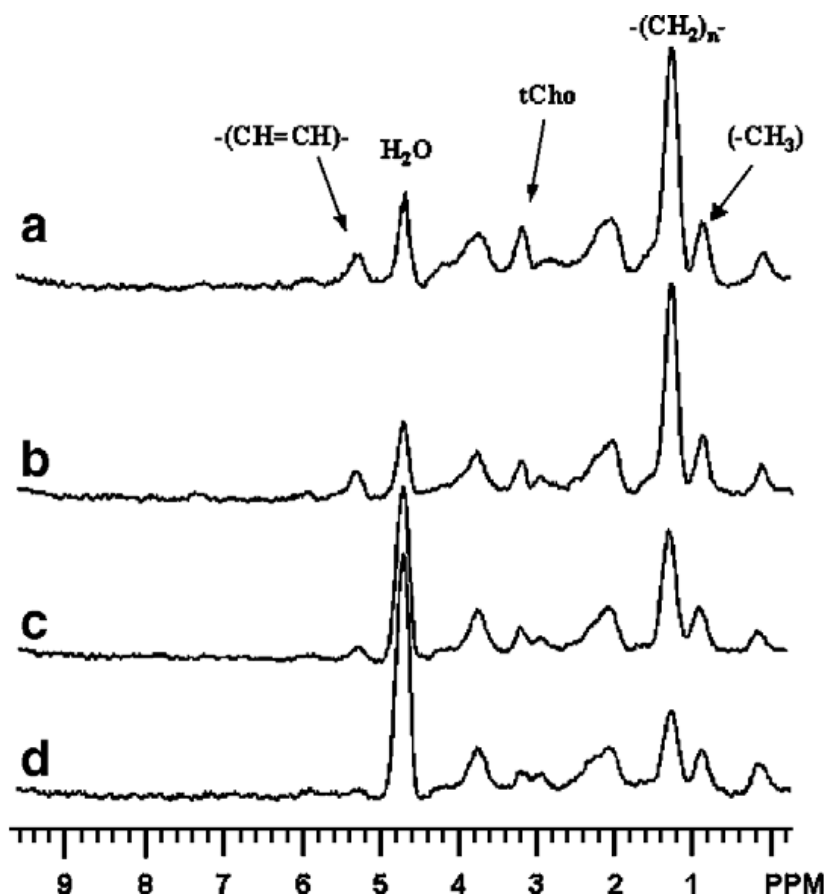


Figura 1.15: Espectres de  $^1\text{H}$ -RMN ponderats en difusió de cèl·lules DU145 de carcinoma de pròstata humana perfundides crescudes en poliestirè (Milkevitch *et al.*, 2005). a- cèl·lules tractades durant 16 h amb fenilbutirat 10mM ( inducció d'apoptosi); b-cèl·lules tractades durant 16 h amb fenilacetat 10mM (inducció d'apoptosi); c-cèl·lules control de 16h; d-cèl·lules control a 1h. Com es pot comprovar, la intensitat del senyal a 1,3 ppm, corresponent als ML, augmenta amb la inducció d'apoptosi respecte dels controls.

(Nadal *et al.*, 1997) defensen un altre possible mecanisme que pot contribuir a la desregulació de la síntesi de lípids i colesterol en cèl·lules d'origen neoplàsic. S'ha observat que en cèl·lules tumorals el cicle de l'àcid tricarboxílic està truncat després de la síntesi de citrat (Lavietes & Coleman, 1980). La major part del citrat és extret des del mitocondri al citosol, on pot ser utilitzat en la síntesi d'àcids grassos i colesterol (Parlo & Coleman, 1984), No obstant això, encara no s'ha estudiat si els àcids grassos sintetitzats a través d'aquesta via s'acumulen en les cèl·lules en forma de triacilglicerols.

A més, altres estudis duts a terme en cèl·lules en cultiu mostren que **les cèl·lules**

**viables també poden presentar senyals de ML.** Barba i col·laboradors (Barba *et al.*, 1999; Barba *et al.*, 2001) va mostrar que l'estrés cel·lular degut a pH àcid i l'aturada de la proliferació després de la confluència produeixen un augment en la intensitat dels senyals de ML i també en el contingut de gotícules lipídiques en cèl·lules C6. Les cèl·lules C6 de glioma de rata estudiades per microscòpia de fluorescència mostraven en el seu citosol la presència de gotícules lipídiques. L'augment en el senyal de ML provocat pels diferents tractaments correlacionava amb l'augment del percentatge de cèl·lules amb gotícules (figura 1.14).

Callies i col·laboradors (Callies *et al.*, 1993) va descriure l'aparició de gotícules lipídiques citosòliques correlacionades amb l'aparició de senyals de lípids neutres en els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de cèl·lules de mieloma cultivades en presència d'oleat exogen. Holmes i col·laboradors (Holmes *et al.*, 1987) també van mostrar la presència de senyals de ML en cèl·lules viables de diferents línies cel·lulars. Delikatny i col·laboradors (Delikatny *et al.*, 1996a) van investigar si l'alteració de les condicions de cultiu de cèl·lules L de fibroblasts murins transformats, que inicialment no presentaven senyal de lípids mòbils en l'espectre d'RMN, induïa la presència d'aquests senyals lipídics. Aquestes alteracions van consistir en atenuar la proliferació cel·lular mitjançant la disminució del pH del medi fins a valors àcids, l'eliminació del sèrum del medi de cultiu o l'arribada a la confluència. Van observar un augment del senyal de lípids mòbils en cèl·lules confluents o cultivades a pH = 6,1, efecte que s'amplificava si a les condicions anteriors se li afegia l'eliminació del sèrum del medi de cultiu. No van trobar però una relació entre la presència de lípids mòbils i la fase del cicle cel·lular. També van adquirir espectres bidimensionals, observant que en condicions de pH baix o confluència, l'aparició dels pics de lípids anaven associats a un augment del senyal de GPC i que això podria estar associat a la hidròlisi de la fosfatidilcolina de la membrana plasmàtica a GPC, alliberant-se àcids grassos que podrien reesterificar-se per a formar triacilglicerols.

Alguns grups han correlacionat l'aparició de gotícules amb el metabolisme de fosfatidilcolina. Jackowski va descriure que el metabolisme dels fosfolípids i el cicle cel·lular estan coordinats (Jackowski, 1994). Segons la mateixa autora (Jackowski, 1996), la fase G1 estaria caracteritzada per processos ràpids i simultanis de degradació i resíntesi de la fosfatidilcolina. Durant la fase S es doblaria la quantitat de fosfolípids presents en la cèl·lula degut al fet que continuaria la seva síntesi però es reduiria dràsticament la degradació de la fosfatidilcolina de la membrana, el que conduiria a una acumulació neta de fosfolípids. Les fases G2 i M estarien caracteritzades per una aturada del metabolisme fosfolípidic (tant en els processos de síntesis com de degradació). Tota aquesta informació es troba resumida en la figura 1.16. Jackowski i col·laboradors (Jackowski *et al.*, 2000) van observar també que l'aturada del cicle cel·lular en una línia cel·lular de macròfags en la fase G1 per tractament amb dibutiril-cAMP reduïa la síntesi de fosfolípids, de manera que el diacilglicerol (DAG) es desviava cap a la síntesi de triacilglicerols (TAG) (figura 1.17). Això probablement era degut al fet que l'aturada del creixement cel·lular feia que no fos necessari la síntesi de membrana nova, i els DAG es derivarien cap a la síntesi de triacilglicerols. Segons Jackowski, aquests resultats indicaven que la síntesi de fosfolípids estava associada a la proliferació cel·lular, i per tant al cicle cel·lular.

L'enzim CCT (CTP:fosfocolina citidililtransferasa) és l'enzim que limita la velocitat de la biosíntesis de la fosfatidilcolina (figura 1.18). (Pelech & Vance, 1984; Pelech *et al.*, 1984), i s'han observat fluctuacions en la seva activitat depenents del cicle cel·lular (Jackowski, 1996). Per tant, aquests resultats mostrarien que una de les causes que podria explicar l'acumulació de TAG, i per tant ML, en cèl·lules amb el creixement cel·lular aturat seria la desregulació en la síntesi de la fosfatidilcolina. Jackowski i col·laboradors (Jackowski *et al.*, 2000) han comprovat que la síntesi d'àcids grassos, necessària per a la síntesi de DAG, no era un procés regulat pel cicle cel·lular però sí per la presència de factors de creixement, que augmentaven els ni-

vells d'expressió dels enzims acetilCoA carboxilasa (ACC) i sintasa d'àcids grassos (FAS) (figura 1.17). També van observar que la velocitat de conversió de DAG a TAG era inversament proporcional a l'activitat de la CCT, ja que la inhibició de CCT amb inhibidors específics es traduïa en una acumulació de TAG. Per tant, l'enzim CCT seria un punt important de control, ja que en funció de la seva activitat dirigiria el DAG cap a la síntesi de PL o TAG (això es trobat esquematitzat en la figura 1.17). No cal oblidar que l'acumulació de TAG també podria estar originada per una producció excessiva d'AG i G3P, a causa de una desregulació de la glucòlisis i de l'activitat de l'enzim FAS.

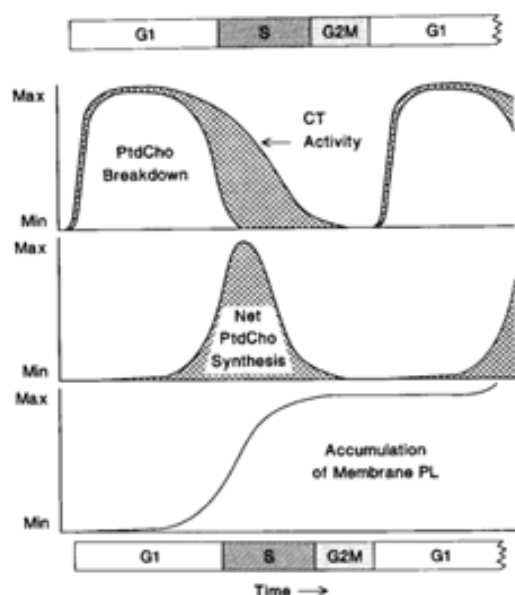


Figura 1.16: Esquema dels esdeveniments periòdics que es produeixen en el metabolisme de fosfolípids al llarg del cicle cel·lular (Jackowski & Fagone, 2005)

En els últims anys s'ha investigat la relació existent entre **l'activació de la hidròlisi de la fosfatidilcolina i l'aparició de senyals de lípids mòbils** en cèl·lules tumorals i embrionàries (May *et al.*, 1986; Mountford *et al.*, 1996), en cèl·lules actives (Veale *et al.*, 1997) i transformades (Knijn *et al.*, 1997; Ferretti *et al.*, 1999). Veale i col·laboradors (Veale *et al.*, 1997) van observar que en timòcits en els quals s'havia induït l'acumulació de lípids mòbils per estimulació, el tractament amb un inhibidor específic de la fosfolipasa C de PtdCho (PC-*plc*) inhibia aquesta acumulació, el que

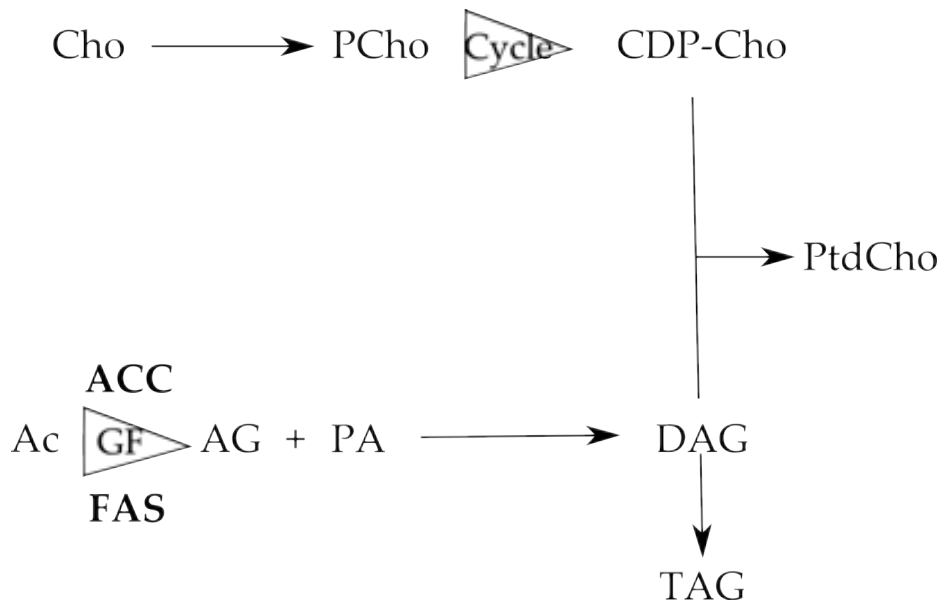


Figura 1.17: Regulació de la distribució d'àcids grassos per la biosíntesi de la PtdCho a través de l'activitat de l'enzim CCT. Figura modificada a partir de la publicada per Jackowski i col·laboradors (Jackowski *et al.*, 2000). L'activitat de l'enzim CCT controlaria el subministre de CDP-colina (CDP-Cho), que juntament amb els DAG s'empra per la síntesi de PtdCho, mentre que els enzims ACC i FAS controlarien la producció de DAG a partir d'àcids grassos i àcid fosfatídic (PA). Quan el DAG no és requerit per la síntesi de membrana, podria convertir-se en TAG. Quan la síntesi de PtdCho augmenta la demanda de DAG, es produiria menys quantitat de TAG. La velocitat de producció d'àcids grassos (AG) a partir d'acetilCoA (Ac) podria ser regulada per factors de creixement (GF), però seria independent del cicle cel·lular, mentre que l'activitat de la CCT si dependria del cicle cel·lular (Cycle). Abreviacions: ACC, acilCoA carboxilasa; FAS, sintasa d'àcids grassos.



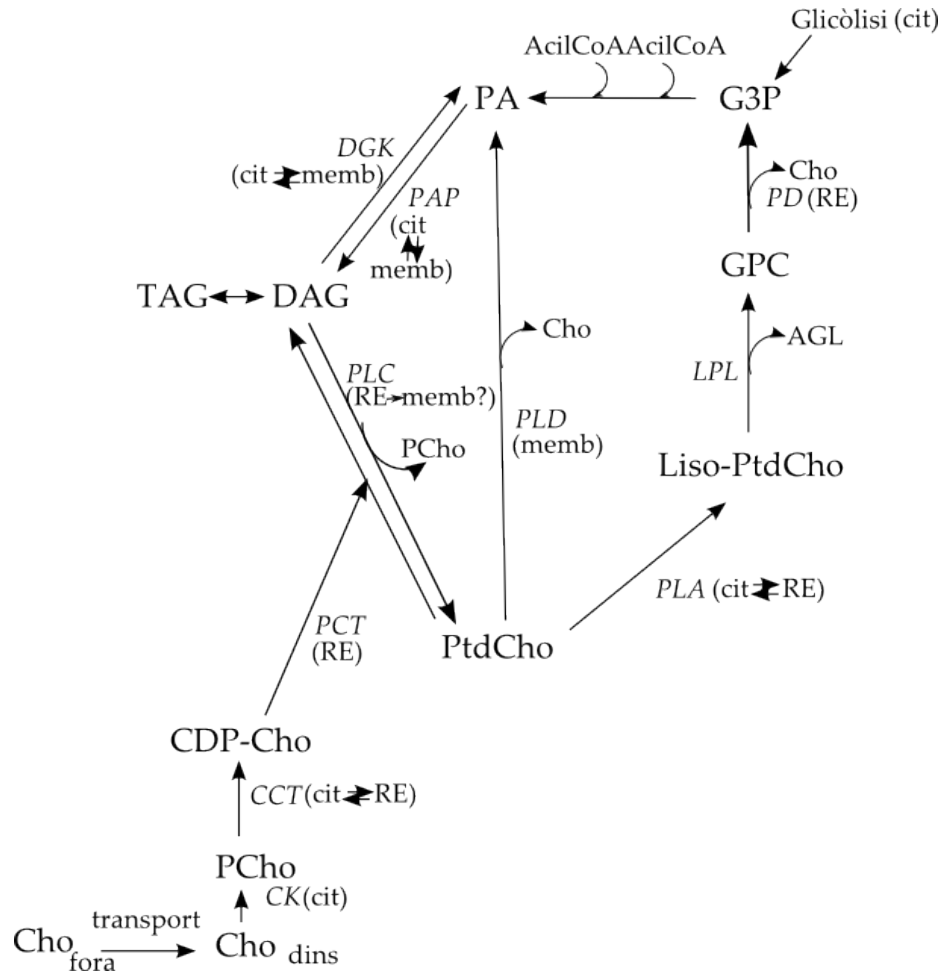


Figura 1.18: Vies de síntesi de fosfolípids modificat de Podo (Podo, 1999). Compartiments cel·lulars: RE, reticle endoplàsmic; cit, citosol; memb, membrana cel·lular. Metabòlits: Cho, colina; PCho, fosfocolina; CDP-colina, citidina difosfat colina; DAG, diacilglicerols; PA, àcid fosfatídic; Liso-PtdCho, lisofosfatidilcolina (1-acil o 2-acil fosfatidilcolina); AGL, àcids grassos lliures; GPC, glicerol-3-fosfocolina; G3P, glicerol 3-fosfat; AcilCoA, acil coenzim A. Enzims: CK, colina quinasa; CCT, CTP:fosfocolina citidililtransferasa; PCT, fosfocolina transferasa; DGK, ATP:1,2 diacilglicerol 3-fosfotransferasa; PAP, fosfatidat fosfohidrolasa; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; PLA, fosfolipasa A2 i fosfolipasa A1; PD fosfodiesterasa; AT, glicerol-3-fosfat aciltransferases; LPL, lisofosfolipasa; DKG, diacilglicerol aciltransferasa.

indicava que el catabolisme de la PtdCho contribuïa en part a l'acumulació de lípids neutres i a l'observació de senyals de ML en l'espectre d'RMN de  $^1\text{H}$ . En contrast amb els resultats obtinguts per als timòcits, també es va observar que la intensitat dels senyals de ML generats en esplenòcits estimulats no disminuïa amb la inhibició de la PC-*plc*, el que podria indicar que en el cas dels esplenòcits altres enzims (com la *pla*<sub>2</sub> i la fosfolipasa D, *pld*) podrien estar implicades en el catabolisme de la PtdCho en aquestes cèl·lules.

En l'estudi publicat per Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) es va investigar la naturalesa i la localització subcel·lular dels lípids mòbils en fibroblasts NIH-3T3 i les seves transformades H-*ras*. En experiments anteriors realitzats per aquest grup (Knijn *et al.*, 1997) s'havia obtingut el resultat que els fibroblasts transformats amb l' oncogen *ras* presentaven senyals menys intensos de ML que els fibroblasts no transformats. Un dels aspectes que van estudiar va ser si la hidròlisi de la PtdCho estava associada a la formació de ML mitjançant experiments d'inhibició selectiva de la PC-*plc* o addició de fosfolipasa C exògena, d'origen bacterià. La inhibició de la PC-*plc* donava lloc a una disminució del  $20\pm 10\%$  en el contingut de ML tant de les cèl·lules 3T3 com 3T3<sup>*ras*</sup>, mentre que l'addició de PC-*plc* augmentava el contingut de ML d'ambdues línies cel·lulars. Segons ells, aquests resultats probaven la contribució de la hidròlisi de la fosfatidilcolina per la fosfolipasa C en la formació de ML i suggerien que els DAG eren uns possibles precursors/constituents dels ML.

Podo i col·laboradors (Podo *et al.*, 1996) ja havien suggerit anteriorment que aquests DAG podrien ser utilitzats per la cèl·lula com precursors de fosfolípids o convertits en TAG i que l'acumulació d'aquests TAG en gotícules tant a nivell de membrana plasmàtica com de citoplasma representava una reserva de nutrients en condicions d'oxigenació i perfusió sanguínies baixes. Aquesta hipòtesi estaria sustentada pels treballs amb tècniques histoquímiques i de microscòpia electrònica de Freitas i col·laboradors (Freitas *et al.*, 1990; Freitas, 1990), que van observar la presència de

gotícules lipídiques intracel·lulars (mitjançant tinció amb el fluorocrom *Nile Red*) en cèl·lules hipòxiques (que es trobaven en la vora de la zona necròtica i a uns  $130\mu\text{m}$  d'un vas sanguini) i en cèl·lules necròtiques de tumors induïts en ratolí (carcinoma de Ehrlich). També van observar un progressiu desplaçament de la fluorescència des de vermell cap al groc per a les membranes de les cèl·lules pertanyents al tumor (en cèl·lules tenyides amb *Nile Red*, la fluorescència groga s'atribueix a lípids neutres—triacilglicerols o èsters de colesterol—mentre que la fluorescència vermella prové de fosfolípids, altres lípids amfipàtics i les proteïnes de membrana (Greenspan *et al.*, 1985)) el que van interpretar com la presència poc corrent de dominis de lípids neutres inserits en la bicapa fosfolípida. Els estudis per microscòpia electrònica van mostrar que les gotícules lipídiques citoplasmàtiques estaven associades a mitocondris en fase degenerativa, a partir de la qual cosa van concloure que l'aparició de gotícules lipídiques estava associada als danys produïts a nivell mitocondrial associats a un procés d'isquèmia. El procés d'hipòxia produiria una activació de les fosfolipases de la membrana mitocondrial, la degradació dels fosfolípids d'aquestes membranes i això donaria lloc a un alliberament d'àcids grassos que s'acumularien en forma de triacilglicerols.

Com ja s'ha comentat anteriorment, les gotícules lipídiques citosòliques i/o els dominis intramembrana poden estar constituïdes, a més de per TAG, per èsters de colesterol. Existeixen cèl·lules i teixits en els quals s'ha comprovat la presència d'èsters de colesterol (detectat en la major part dels casos mitjançant anàlisi química dels extractes lipídics) formant part de les gotícules lipídiques citoplasmàtiques, mentre que en altres casos no s'ha detectat la seva presència.

En un treball realitzat per Finstad i col·laboradors (Finstad *et al.*, 1998) es van investigar els efectes de l'exposició de cèl·lules O937 (derivades de la línia cel·lular O937-GTB, que és una línia cel·lular de limfoma) a l'àcid eicosapentanoic (EPA). Una concentració d'EPA  $60\mu\text{m}$  originava una disminució de la proliferació cel·lular, sen-

se afectar la viabilitat cel·lular. A concentracions majors d'EPA (120  $\mu$  m) s'observava la presència d'apoptosi. En les cèl·lules tractades amb EPA 60  $\mu$ m es va observar mitjançant microscòpia electrònica l'acumulació de gotícules lipídiques citosòliques. Aquesta acumulació era reversible, ja que quan les cèl·lules eren reincubades amb medi sense EPA de manera que les cèl·lules proliferaven a la velocitat normal, es produïa la desaparició de les gotícules acumulades en el citoplasma. També van determinar el contingut en TAG i colesterol de l'extracte lipídic total de cèl·lules tractades amb EPA i de cèl·lules sense tractar, observant que després de tres dies d'incubació amb EPA 60  $\mu$ m la quantitat de TAG va passar de 5 nmols TAG/mg de proteïna a 78 nmols de TAG/mg de proteïna, mentre que la quantitat de colesterol era similar, el que segons ells indicava que les gotícules lipídiques estaven constituïdes majoritàriament per TAG.

En contrast amb el resultat anterior, en el treball de Hirakawa i col·laboradors (Hirakawa *et al.*, 1991) van observar que, en cèl·lules a les quals se'ls havia transferit el gen ras i un gen sensible a la temperatura (SV40 T antigen) i que presentaven inhibició del creixement cel·lular quan es treballava a una temperatura en la qual l'antigen T no era estable (39 °C), aquesta inhibició anava acompanyada per acumulació de gotícules en el citoplasma (observades mitjançant tinció amb Oil Red). L'anàlisi mitjançant TLC dels extractes lipídics de cèl·lules mantingudes a 39 °C mostrava l'acumulació de TAG i ésters de colesterol. També van observar que cèl·lules cultivades amb sèrum humà sense lipoproteïnes no acumulaven ésters de colesterol, mentre que l'acumulació de TAG no es veia afectada. Altres autors també han observat la presència d'ésters de colesterol formant part de les gotícules lipídiques (Schneeberger *et al.*, 1971; DiAugustine *et al.*, 1973).

Diversos autors han trobat que el metabolisme del colesterol està alterat en processos tumorals (Dessi *et al.*, 1992; Nygren *et al.*, 1997). Alguns autors han observat en cèl·lules tumorals un augment de la biosíntesi del colesterol a causa d'una desre-

gulació de l'activitat de l'enzim hidroximetilglutaril-CoA sintetasa (pèrdua del control negatiu per part de la concentració de colesterol) (Sabine, 1976) o un augment de 6 a 14 vegades de la seva activitat específica (Erickson *et al.*, 1988). Altres autors han observat alteracions en el transport intracel·lular a causa de la pèrdua de les proteïnes transportadoras del grup esterol SCP-2 (Schroeder *et al.*, 1984).

En el cas de cultius cel·lulars *in vitro* el colesterol emmagatzemat en les gotícules pot procedir tant de les lipoproteïnes del sèrum amb el qual es cultiven com tenir un origen anabòlic.

L'augment en la intensitat dels senyals de ML semblaria indicar un augment en el contingut total en les cèl·lules dels lípids que els originen. Alguns autors han descrit un augment relatiu en el contingut de lípids neutres en models cel·lulars d'apoptosi (Iorio *et al.*, 2003). També s'han desenvolupat alguns treballs previs on es mesurava el contingut de TAG en cèl·lules viables. En aquests cas, Rosi i col·laboradors (Rosi *et al.*, 1999) van descriure una disminució relativa en el contingut de TAG per anàlisi per  $^1\text{H}$ -RMN en extractes de cèl·lules HeLa mantingudes en cultiu. Els autors correlacionaven aquesta disminució amb la disminució observada en els senyals de ML en els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN de cèl·lules HeLa intactes amb el temps de cultiu.

Per tant, sembla que els processos cel·lulars que poden conduir a l'aparició de senyals de ML són molt diversos: alentiment de la proliferació, necrosi, apoptosi i dany citotòxic. A més els processos bioquímics que es produeixen en les cèl·lules per generar els lípids que originen els ML no estan ben caracteritzats, encara que podrien probablement involucrar el metabolisme de fosfolípids de membrana.

### **1.3.3 Metabolisme de gotícules lipídiques i lípids neutres en cèl·lules eucariotes.**

Les gotícules lipídiques es troben presents en tot tipus de cèl·lules eucariotes. La funció més acceptada d'aquestes gotícules és emmagatzemar lípids neutres com a

font d'energia o de components necessaris, majoritàriament lípids, per la síntesi de membranes o de compostos específics( per exemple, HMG-CoA, un intermediari de la ruta de síntesi del colesterol). Però sembla ser que les gotícules lipídiques poden tenir també altres funcions, que encara no estan ben definides (Zweytick *et al.*, 2000; Murphy, 2001). Per conèixer la funció d'aquestes partícules i la de la seva dinàmica pot ser convenient tenir en compte el tipus de proteïnes de membrana que tenen associades (Murphy & Vance, 1999).

La seva estructura és força simple i ha estat descrita per diversos autors. DiAugustine i col·laboradors (DiAugustine *et al.*, 1973) van comprovar que estan formades per un nucli de lípids neutres, principalment triacilglicerols i èsters de colesterol, envoltat per una monocapa de fosfolípids amb una petita quantitat de proteïnes. Schneeberger i col·laboradors (Schneeberger *et al.*, 1971) van estudiar l'estructura i composició de les gotícules lipídiques que es formaven en el citoplasma de fibroblasts L quan aquests es cultivaven amb un excés d'àcid gras exogen. L'anàlisi química d'aquestes gotícules va mostrar que estaven formades majoritàriament per TAG (90-92%) i la resta per petites quantitats de lípids polars, èsters de colesterol, monoglicèrids i diglicèrids. A l'estudiar aquestes gotícules lipídiques per microscòpia electrònica van observar que cada gotícula estava envoltada per una fina membrana de material osmiofílic que presentava l'aparença bilamelar d'una membrana plasmàtica o del reticle endoplasmàtic llis. Guyton i Klemp (Guyton & Klemp, 1988) també van observar la presència d'una fina membrana envoltant les gotícules lipídiques presents en teixit arterial arterioescleròtic. La característica principal de les gotícules lipídiques en mamífers és que el contingut en fosfolípids és d'un 5% de la massa total. Això seria suficient per formar només una monocapa que recobris les gotícules (Zweytick *et al.*, 2000).

Les gotícules van ser observades per primera vegada en cèl·lules de mamífers per Jensen i col·laboradors (Jensen & Kofod, 1966). Així, aquests autors van descriu-

re la presència de partícules lipídiques en cor de vaca que tenien un alt contingut en triacilglicerols, i una petita quantitat de proteïnes. La presència de gotícules en cor de vaca va ser també confirmada per Christiansen i col·laboradors (Christiansen & Jensen, 1972). Posteriorment han estat detectades en plantes (Wahlroos *et al.*, 2003), cèl·lules de nematodes (Rubin & Trelease, 1976), algues (Roessler, 1988) o llevats (Clausen *et al.*, 1974). També en presenten alguns tipus de cèl·lules procariotes (Zweytick *et al.*, 2000).

Les gotícules lipídiques semblen estar associades a altres orgànuls cel·lulars (Schlunk & Lombardi, 1967). Christiansen i col·laboradors (Christiansen & Jensen, 1972) van descriure gotícules lipídiques citosòliques en cor de vaca associades a mitocondri, i van suggerir un possible paper com a font d'àcids grassos en la producció energètica mitocondrial per  $\beta$ -oxidació. Franke i col·laboradors (Franke *et al.*, 1987) van detectar proteïnes de filaments intermedis del citoesquelet formant una xarxa en les proximitats de les gotícules. Proposaven que els filaments formaven una "caixa" que impedia la fusió de les gotícules entre si. La interacció de les gotícules amb els filaments intermedis del citoesquelet va ser posteriorment confirmada per microscòpia de transmissió (Almahbobi *et al.*, 1993).

Ferretti i col·laboradors van observar que els fibroblasts 3T3 transformats amb l' oncogen *ras* no acumulaven ML i ho van atribuir a que les cèl·lules transformades experimentaven alteracions morfogenètiques i d'arquitectura tant a nivell de citoesquelet com de membrana (Ferretti *et al.*, 1999). De fet, en treballs previs ja s'havia observat que en la formació i el manteniment de les gotícules lipídiques citoplasmàtiques podien estar implicats els components del citoesquelet (Franke *et al.*, 1987; Aoki *et al.*, 1997). Franke i col·laboradors van trobar que el procés de diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1 en adipòcits, durant el qual es formen gotícules lipídiques en el citoplasma, anava acompanyat per un canvi en l'organització dels IFs (filaments intermedis) de vimentina (Franke *et al.*, 1987), que passaven d'estar disposats en for-

ma de feixos en el citoplasma a estar associats amb les gotícules lipídiques formant anells amb una disposició regular al voltant d'aquestes. Aquesta reordenació de la vimentina podria tenir un paper en la formació i creixement de les gotícules, impedit la coalescència prematura de les gotícules i la hidròlisi dels triacilglicerols per part de les lipases.

Lieber i col·laboradors (Lieber & Evans, 1996) van avaluar l'efecte de la desestructuració del filament de vimentina sobre el procés de formació de gotícules lipídiques en adipòcits, observant que l'alteració d'aquests filaments reduïa de forma significativa la seva formació. Traub i col·laboradors (Traub *et al.*, 1985) van aïllar la proteïna vimentina de cèl·lules tumorals "Ehrlich ascites"(EA) i van observar que aquesta estava contaminada amb una gran quantitat de lípids neutres (colesterol, èsters de colesterol, mono-,di- i triacilglicerols), sent una possible explicació que en aquestes cèl·lules la vimentina també estigués unida a gotícules lipídiques. Posteriorment, Freitas i col·laboradors (Freitas *et al.*, 1990) van observar l'acumulació de gotícules lipídiques en cèl·lules hipòxiques i perinecròtiques de tumors experimentals induïts per la inoculació d'aquestes mateixes cèl·lules (EA) en ratolí.

Segons Röser i col·laboradors (Röser *et al.*, 1991) un 80% de les cèl·lules C6 (subclons) de glioma de rata expressen la proteïna vimentina, mentre que els subclons restants no expressen cap de les proteïnes que constitueixen els filaments intermedis.

El component principal de les gotícules, els triacilglicerols, són sintetitzats per l'enzim acil CoA:diaciltransferasa (DGAT EC 2.3.1.20) Aquest enzim es localitza principalment a reticle endoplàsmic (Coleman & Lee, 2004), i l'enzim unit a membrana ha estat parcialment purificat de microsomes de fetge de rata (Polokoff & Bell, 1980). A la figura 1.19 es mostren altres enzims que participen en el metabolisme dels triacilglicerols. S'ha descrit també que els diacilglicerols (DAG) generats a la membrana de cèl·lules CHO (Chinese Hamster Ovary) per l'enzim fosfolipasa C són emprats per sintetitzar triacilglicerols (Igal *et al.*, 2001). En l'article de 1998 de



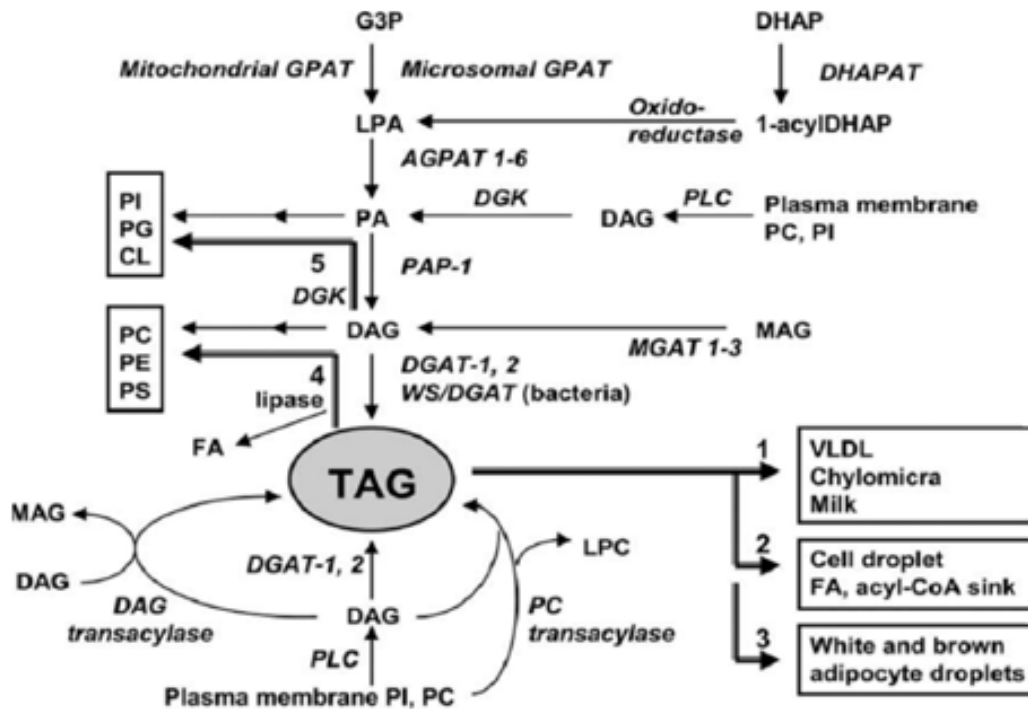


Figura 1.19: Rutes metabòliques dels triacilglicerols (Coleman & Lee, 2004). Ruta 1, síntesi de VLDL, quilomicrons, llet; Ruta 2, segrest d'àcids grassos i acil-CoAs potencialment tòxics; Ruta 3, magatzem d'energia en gotícules d'adipòcits; Ruta 4, provisió de diacilglicerol per síntesi de fosfolípids; i Ruta 5, provisió de fosfatidat per síntesi de fosfolípid. AGPAT, acilglicerol-P aciltransferasa; CL, cardiolipina; DAG, diacilglicerol; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; DGK, diacilglicerol kinaasa; DHAP, dihidroxiacetona-P; DHAPAT, DHAP aciltransferasa; FA, àcid gras; G3P, glicerol-3-fosfat; GPAT, glicerol-P aciltransferasa; LPA, àcid lisofosfatidic; LPC, lisofosfatidilcolina; MAG, monoacilglicerol; MGAT, monoacilglicerol aciltransferasa; PA, àcid fosfatidic; PAP, àcid fosfatidic fosfohidrolasa; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PLC, fosfolipasa C; PS, fosfatidilserina; TAG, triacilglicerol; WS, sintasa èster de cera.

Vance (Vance, 1998) es troben recollits els diferents enzims de síntesi lipídica que es troben duplicats en les cèl·lules eucariotes, i que poden estar relacionats amb magatzems de lípids amb funcions biològiques diferenciades. Entre ells no es troba però la DGAT.

Els mecanismes que porten a la formació dels cossos lipídics són diversos (Murphy & Vance, 1999). En fetge (hepatòcits) i budell (enteròcits) les gotícules se sintetitzen al reticle endoplàsmic, se secreten via RE-Golgi, i contenen majoritàriament la proteïna apolipoproteïna B (Murphy & Vance, 1999) (figura 1.20). En adipòcits, es

generen a RE i s'alliberen al citosol, contenint majoritàriament perilipina i *adipose differentiation-related protein* (ADRP) (Brasaemle *et al.*, 1997). En cèl·lules adrenals, testicles i ovaris, l'origen és el RE, s'alliberen també a citosol, i contenen també perilipina i ADRP (Londos *et al.*, 1995). En cèl·lules de mama i epitelials, l'origen és a RE, se secreten via exocitosi i contenen majoritàriament ADRP (Heid *et al.*, 1996). I finalment en altres cèl·lules, com els leucòcits, l'origen és a RE, s'alliberen a citosol i sembla que contenen ADRP (Bozza *et al.*, 1996).

Com ja s'ha comentat, també es troben gotícules lipídiques en teixits patològics, o en cèl·lules en les quals la seva funció no es troba totalment definida (Hakumaki & Kauppinen, 2000). En neutròfils i macròfags es formen nombrosos cossos lipídics en resposta a estímuls inflamatoris (Weller *et al.*, 1991). En alguns casos, un augment en el recanvi membranar i una aturada en la biosíntesi de fosfolípids podria induir l'acumulació de lípids en forma de gotícules citosòliques (Hakumaki & Kauppinen, 2000). En cor de gats, s'ha detectat la presència de gotícules lipídiques després d'una isquèmia regional aguda de miocardi per microscòpia electrònica de transmissió (Jodalen *et al.*, 1985). El nombre de gotícules és més alt en zones de penombra, al voltant de la zona isquèmica, que en zones ben perfundides i que en zones totalment isquèmiques. Sembla doncs que les gotícules apareixen en zones sotmeses a estrès, però amb un funcionament encara normal del seu metabolisme. En cèl·lules REF52 d'embrions de ratolí transformades amb l'ongogen *ras* es produïa una acumulació de lípids neutres quan s'aturava la seva proliferació cel·lular (Hirakawa *et al.*, 1991). Els autors suggerien una relació entre l'oncogen *ras* i el procés d'acumulació dels lípids.

Tal i com s'ha comentat prèviament, teixits necròtics (Rémy *et al.*, 1997), apoptòtics (Hakumaki *et al.*, 1999) i cèl·lules en cultiu en condicions d'estrès (Barba *et al.*, 2001) i apoptosi (Iorio *et al.*, 2003) presenten també gotícules citosòliques. De tota manera, els processos que porten a la seva detecció, per RMN i microscòpia, i el seu

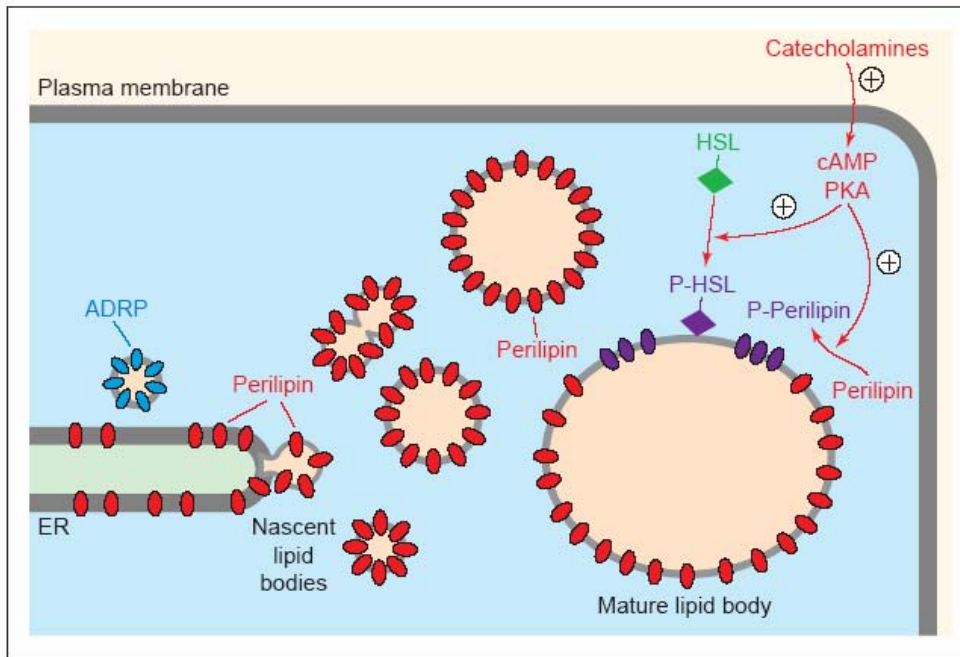


Figura 1.20: Esquema de la formació de gotícules lipídiques en adipòcits (Murphy & Vance, 1999). La figura mostra un possible mecanisme de formació i mobilització de cossos lipídics de reserva grans en teixit adipós blanc. Mecanismes similars existeixen probablement en teixit adipós marró i cèl·lules esteroidogèniques. Cossos lipídics petits produïts al reticle endoplasmàtic en cèl·lules no diferenciades i en etapes primerenques de la diferenciació dels adipòcits tendeixen a estar associades a la proteïna ADRP (*adipose differentiation-related protein*, proteïna relacionada amb la diferenciació dels adipòcits). En etapes posteriors, la perilipina és la proteïna majoritària en els cossos lipídics. Els cossos lipídics pateixen una sèrie de fusions regulades fins que assoleixen la mida madura que és determinada pel tipus de cèl·lula. Els cossos lipídics embolcallats per perilipina només es trenquen per activació hormonal induïda per fosforilació, per la proteïna kinasa A (PKA), de la perilipina i la lipasa sensible a hormones (HSL). La perilipina fosforilada probablement reorganitza la superfície dels cossos lipídics per permetre l'accés de la HSL, i conseqüentment la hidròlisi, del core lipídic

significat a nivell bioquímic quant a la seva funcionalitat cel·lular són encara poc coneguts.

## 1.4 Cèl·lules C6 com a model cel·lular per l'estudi de ML i gotícules lipídiques.

El 1968, Benda i col·laboradors publiquen un article en què descriuen una línia derivada de tumor glial de cervell de rata induït amb nitrosurea (Benda *et al.*, 1968). Aquesta línia té la peculiaritat d'induir tumors quan les cèl·lules s'injecten al cervell de rates sanes. Les cèl·lules s'anomenen C6 de glioma de rata, i són una línia tumoral ben caracteritzada que ha estat ampliament emprada com a model cel·lular que pot mostrar senyals de lípids mòbils en el seu espectre en condicions de cultiu determinades (Barba *et al.*, 1999; Barba *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002). El seu us ha estat descrit com a sistema model per l'estudi de glioblastomes (Grobbsen *et al.*, 2002).

Com ja s'ha comentat, les cèl·lules C6 han estat estudiades per  $^1\text{H}$ -RMN, tant en cultiu com en tumors induïts per aquestes cèl·lules. Diversos autors han correlacionat l'aparició de gotícules lipídiques amb la de senyals de lípids mòbils en els espectres de cèl·lules C6 (Barba *et al.*, 1999; Barba *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2002) i de tumors induïts per aquestes cèl·lules (Zoula *et al.*, 2003a; Zoula *et al.*, 2003b). També s'han realitzat estudis del patró espectral d'extractes PCA de les cèl·lules al llarg de la seva corba de creixement (Valverde *et al.*, 2006).

Molts estudis sobre el metabolisme de les cèl·lules C6 s'han realitzat mitjançant experiments de  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$ -RMN. La informació que poden proporcionar aquest tipus d'experiments és d'una gran importància i interès. Donat que aquestes cèl·lules són un model de tumor glial, l'estudi del seu metabolisme podria ajudar a entendre millor el metabolisme en aquest tipus de tumors en humans.

El  $^{13}\text{C}$  representa només l'1,1% del carboni total, i té una constant giromagnètica

que és aproximadament 1/4 de la del protó. Aquests dos fets fan que la  $^{13}\text{C}$ -RMN sigui una tècnica relativament insensible. El rang de desplaçament químic del  $^{13}\text{C}$  és molt ampli, 300 ppm aproximadament. El problema de la sensibilitat es pot solucionar emprant substàncies enriquides en  $^{13}\text{C}$  en posicions específiques. La utilització de  $^{13}\text{C}$ -RMN i productes selectivament marcats amb  $^{13}\text{C}$  ha permès realitzar un gran nombre d'estudis metabòlics *in vivo* i *in vitro* (per una revisió, consultar (Cerdan & Seelig, 1990)). L'alt cost dels isòtops enriquits en  $^{13}\text{C}$  i de l'equipament han fet que de moment els estudis de  $^{13}\text{C}$ -RMN no formin part de la rutina clínica.

La  $^{13}\text{C}$ -RMN ha permès dur a terme diversos estudis *in vivo* sobre el metabolisme cerebral, per exemple de la glucosa i la glutamina (García-Espinosa *et al.*, 2004) i altres (Cerdán, 2003).

En el cas de les cèl·lules C6, s'ha estudiat el flux metabòlic de les cèl·lules prèviament incubades amb [1]- $^{13}\text{C}$ -glucosa (Portais *et al.*, 1993). Es van considerar els processos de glucòlisi, gluconeogènesi, cicle dels àcids tricarbòxílics i algunes reaccions de metabolisme proteic i lipídic, i conclouen, entre d'altres, que la glucosa donava lloc al 78% del piruvat i al 57% de l'acetil coenzim A sintetitzat. El mateix grup va estudiar el metabolisme de glucosa i glutamina en les cèl·lules C6 (Portais *et al.*, 1996). Van realitzar experiments d'incubació de les cèl·lules amb [1]- $^{13}\text{C}$ -glucosa durant períodes d'entre 2 i 48h, amb o sense glutamina, i es van estudiar els extractes àcids de les cèl·lules per  $^{13}\text{C}$ -RMN per determinar el destí metabòlic dels dos compostos. Van concloure que la glutamina tenia una funció anapleròtica, per proporcionar carbonis als intermediaris del cicle de Krebs, mentre que la glucosa tenia com a funció principal el subministre d'energia a les cèl·lules. Bouzier i col·laboradors (Bouzier *et al.*, 1999) van emprar les cèl·lules C6 per induir tumors en rata i estudiar el metabolisme de la glucosa. Els tumors van ser infundits amb [1]- $^{13}\text{C}$ -glucosa i es va comprovar que el marcatge en glutamina indicava un origen sanguini d'aquest compost, relacionat probablement amb angiogènesi. Finalment,

Engelmann i col·laboradors (Engelmann *et al.*, 1996) van estudiar l'efecte del fàrmac miltefosina en cèl·lules C6. Aquest fàrmac proapoptòtic provoca en les cèl·lules C6 només un alentiment de la proliferació. Les cèl·lules van ser tractades amb miltefosina i incubades en [1]-<sup>13</sup>C-glucosa. Es va comprovar que es produïen canvis en la composició en fosfolípids, i que es produïa un augment en el marcatge de TAG i DAG degut a la miltefosina, desapareixent el marcatge en DAG amb el temps. Els autors no van investigar la possible existència de gotícules lipídiques citosòliques en les cèl·lules C6 estudiades.

La síntesi de TAG i altres lípids neutres i la seva relació amb la formació de gotícules lipídiques citosòliques no ha estat estudiat fins ara per <sup>13</sup>C-RMN en cèl·lules C6.

El <sup>31</sup>P és l'isòtop de P que es troba normalment a la natura, i ha estat el nucli més emprat en estudis del metabolisme energètic. Tot i que és menys sensible que el <sup>1</sup>H, té un rang de desplaçament químic d'unes 30 ppm i no presenta el problema de la supressió del solvent (Gadian, 1995).

L'estudi de les cèl·lules C6 per <sup>31</sup>P-RMN ha proporcionat també molta informació del seu metabolisme. Merle i col·laboradors (Merle *et al.*, 1992) van descriure que les cèl·lules C6 no sintetitzen fosfocolina *de novo* i que presenten variacions en els metabòlits que participen en el metabolisme de membrana respecte d'astròcits de rata sans en cultiu primari. Així mateix Gillies i col·laboradors (Gillies *et al.*, 1994) van determinar que les cèl·lules C6 no sintetitzen colina *de novo*, i que en cèl·lules en aturada de la proliferació els nivells de fosfocolina són més baixos i els de fosfoetanolamina més alts, suggerint una disminució de la síntesi de fosfocolina en aquestes condicions.

Krämer i col·laboradors (Krämer *et al.*, 2002) van mesurar el contingut total de fosfolípids en extractes lipídics de cèl·lules C6 per cromatografia en capa prima. El fosfolípid més abundant en les cèl·lules C6 és la fosfatidilcolina, seguida de fosfati-

diletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidilinositol. Els percentatges sobre el total de fosfolípids que representa cada compost varia quan agumenta el nombre de dies en cultiu.

# Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat entendre l'origen bioquímic i biofísic dels canvis que es produeixen en els ML detectables per RMN de  $^1\text{H}$  de cèl·lules C6 de glioma de rata sota condicions estàndard de cultiu. S'espera que aquest coneixement tingui aplicacions quant a la caracterització no invasiva de gliomes animals i en pacients humans *in vivo*. Els objectius concrets plantejats han estat:

- Caracterització del patró d'aparició de gotícules lípídiques citosòliques, mitjançant microscòpia òptica, i del patró d'aparició dels senyals de ML, mitjançant espectroscòpia d'RMN de  $^1\text{H}$ , en les cèl·lules C6 en condicions de cultiu estàndard i en condicions d'aturada de la proliferació.
- Quantificació dels principals lípids neutres continguts en les cèl·lules C6 (triacilglicerols, diacilglicerols i èsters de colesterol ) en extractes lipídics totals d'aquestes cèl·lules en diferents condicions de proliferació.
- Clarificar l'origen metabòlic dels triacilglicerols cel·lulars mitjançant marcatge per incubació amb  $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-glucosa}$  de les cèl·lules C6.



# Experimental

## 3.1 Cultiu cel·lular

### 3.1.1 Optimització de les condicions de cultiu de les cèl·lules C6

Es van optimitzar les condicions de cultiu de les cèl·lules C6 per obtenir una aparició de gotícules reproduïble al llarg de la corba de creixement. Per fer-ho, es van emprar tant cèl·lules del repositori europeu (ECACC) com del repositori americà (ATCC). Es van provar diverses condicions de cultiu (volum de medi i nombre inicial de cèl·lules sembrades) i de tripsinització de les cèl·lules. Les cèl·lules obtingudes en les diferents condicions van ser estudiades per tinció amb *Nile Red* i microscòpia òptica, i les cèl·lules en condicions optimitzades es van estudiar per  $^1\text{H}$  RMN.

Les cèl·lules C6 ECACC es van cultivar (Barba *et al.*, 1999) inicialment sembrant 15000 cèl·lules/ $\text{cm}^2$  i un volum de medi de 0,5 ml/ $\text{cm}^2$ ; els canvis de medi es van realitzar diàriament a partir del segon dia de cultiu. Les cèl·lules es tripsinitzaven en arribar a un 75-85% de confluència *de visu* (dia 5 de cultiu) utilitzant 2 ml de tripsina/EDTA (0,5 i 0,2 g/litre respectivament) durant 10 min i es posaven de nou en suspensió en 8 ml de medi per procedir al subcultiu.

| nº cèl·lules sembrades/cm <sup>2</sup> | volum de medi (ml/cm <sup>2</sup> ) |
|--|-------------------------------------|
| 15000                                  | 0.2                                 |
| 8000                                   | 0.2                                 |
| 8000                                   | 0.35                                |
| 8000                                   | 0.5                                 |

Taula 3.1: Condicions de cultiu emprades en els experiments d'optimització del cultiu de cèl·lules C6

Pels experiments d'optimització de les condicions de cultiu, les cèl·lules C6 ECACC utilitzades es van cultivar en condicions variables (taula 3.1), a partir de cultius ja establerts en condicions inicials de cultiu.

Es va determinar que les condicions òptimes de cultiu eren 8000 cels/cm<sup>2</sup> i 0,5 ml medi/cm<sup>2</sup>, ja que permetien maximitzar la variació en el nombre de cèl·lules amb gotícules entre fase experimental i postconfluent, com es descriu a la secció 4.1.1.

### 3.1.2 Tripsinització dels cultius

Les cèl·lules C6 ECACC i ATCC es van cultivar en condicions optimitzades (8000 cels/cm<sup>2</sup> i 0,5 ml medi/cm<sup>2</sup>) per la realització d'aquests experiments. Per l'optimització del procés de tripsinització es van posar a prova tres condicions:

1. **Tripsinització amb tripsina a temperatura ambient:** s'afegien 2 ml de tripsina/EDTA (0,5 i 0,2 g/litre respectivament) al flascó durant 10 min. Les cèl·lules eren seguidament posades en suspensió en 8 ml de medi per procedir al subcultiu. Aquesta condició havia estat l'emprada habitualment.
2. **Tripsinització amb tripsina freda (4 °C):** es deixaven 35 ml de tripsina/EDTA durant 15 s sobre el cultiu, es descartava la solució de tripsina, i passats 8 min les cèl·lules es tornaven a suspendre en medi de cultiu.
3. **Utilització d'un cell scrapper:** les cèl·lules es desenganxaven mecànicament emprant un estri per rascar la superfície del flascó. Les cèl·lules eren posteriorment recuperades en medi de cultiu.

## 3.2 Cultiu de cèl·lules C6 ATCC

### 3.2.1 Condicions estàndard de cultiu

Es van emprar cèl·lules C6 del repositori americà (ATCC) enlloc d'ECACC per la resta dels experiments ja que el nombre de passatges ( 64 passatges en un primer lot, 37 en un segon lot) en el moment de fer el dipòsit al repositori era conegut. Es van emprar les condicions de cultiu optimitzades per obtenir una corba de creixement amb aparició de gotícules reproducible tal i com es descriu a 3.1.1 i (Quintero *et al.*, 2001).

Les cèl·lules C6 ATCC es van cultivar en flascons de 75  $cm^2$  (TPP, Barcelona) o de 500  $cm^2$  (LabClinics, Barcelona) a una densitat inicial de 8000 cels/ $cm^2$  i 0.5ml medi/ $cm^2$ . El medi emprat va ser Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Ham F12 (Sigma, Madrid) a pH 7,2. El medi en pols era dissolt en 800 ml d'aigua MilliQ, i s'hi afegien 10 ml de Phenol Red (Sigma) com a indicador de pH i 1,2 g/l  $Na_2CO_3$  com a tamponant. En aquest punt, el pH era ajustat a 7,2 amb àcid clorhídric, i el volum era ajustat a 890 ml. A la campana de cultiu, s'afegia al medi un 10% (v/v) de sèrum FCS (GIBCO, Invitrogen Corporation, Regne Unit), 1000 unitats de penicilina i estreptomina a una concentració final de 10 mg/ml (Sigma) obtenint un volum final d'1 litre. La dissolució final era filtrada amb un filtre estèril (0,22  $\mu m$  de porus i membrana GR *express*; Millipore, Madrid) a una ampolla estèril. El medi es canviava rutinàriament el dia 3 de cultiu i les cèl·lules eren subcultivades el dia 5 (75-85% confluència *de visu*). Les cèl·lules eren mantingudes a 37 °C, 95% humitat i 5%  $CO_2$ , en atmosfera estèril en un incubador Precision Scientific (Chicago, Illinois, EUA).

### 3.2.1.1 Recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 75 $cm^2$

Per la recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 75  $cm^2$ , les cèl·lules eren rentades amb 10 ml de PBS estèril, tripsinitzades emprant 2 ml de tripsina-EDTA (0,5g tripsina i 0,2 g 2Na-EDTA per litre de Hank's Balanced Salt Solution -HBSS- Sigma) i recuperades amb 8 ml de medi DMEM. Les cèl·lules eren comptades i resembrades a la concentració inicial, o bé eren emprades per experiments de microscòpia òptica.

### 3.2.1.2 Recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 500 $cm^2$

En el cas de cultivar cèl·lules per obtenir extractes cel·lulars i per experiments d'RMN, es van emprar flascons de 500  $cm^2$  de superfície per maximitzar el rendiment, però la resta de condicions de cultiu es van mantenir constants. Per la recuperació de cèl·lules sembrades en flascons de 500  $cm^2$ , les cèl·lules eren rentades amb 10 ml de PBS estèril, tripsinitzades amb 12 ml de tripsina-EDTA, i recuperades amb 12 ml de medi. Una alíquota de 100  $\mu l$  era separada per comptar el nombre de cèl·lules. El volum de cada flascó era repartit en 2 tubs de 15 ml, i centrifugat 5 min a 400 x g. Els sediments obtinguts es recuperaven en un únic tub, les cèl·lules es resuspenien en 10 ml de PBS estèril i es centrifugaven de nou 5 min a 400 x g. El tractament del sediment obtingut depenia de la posterior utilització de les cèl·lules.

1. **Obtenció de cèl·lules per extractes:** el sediment era rentat amb 10 ml de PBS estèril, centrifugat 5 min a 400 x g, resuspès en 1 ml de PBS estèril i transferit a un tub criogènic. Aquest tub era congelat en  $N_2$  líquid fins la seva utilització. El pes fresc del sediment es calculava per diferència entre el tub buit i el tub contenint el sediment final. El nombre mínim de cèl·lules emprat per cada extracte era de  $150 \times 10^6$ .
2. **Obtenció de cèl·lules per experiments d'RMN:** el sediment era rentat dues vegades amb 5 ml de [ $^2H$ ]PBS (pH\* = 7,4, on el pH\* és la lectura del pH-metre

no corregida per l'efecte isotòpic del deuteri sobre l'elèctrode) i centrifugat 5 min a 400 x g. El sediment final era transferit amb una pipeta Pasteur a un tub d'RMN de 5 mm de diàmetre extern (Wilmad Glass, EUA). El nombre mínim de cèl·lules emprat per cada experiment era de  $150 \times 10^6$ .

### 3.2.2 Condicions especials de cultiu

#### 3.2.2.1 Incubació de les cèl·lules amb ACSF

En alguns casos, cèl·lules sembrades en flascons de 500  $cm^2$  es van sotmetre a incubació amb fluid cefaloraquidi artificial (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF). Aquest tampó conté 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa i 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, a pH 7,4 (Foxall *et al.*, 1984; Barba *et al.*, 2001). Aquest medi permet mantenir les cèl·lules viables però sense proliferació. El dia 5 de cultiu el medi DMEM era substituït per ACSF en la mateixa relació volum/superfície que el medi, i les cèl·lules es mantenien fins el dia 7 de cultiu. En aquest moment, les cèl·lules eren tripsinitzades i tractades segons l'experiment pel qual s'havien cultivat.

#### 3.2.2.2 Incubació de les cèl·lules amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa

Per dur a terme aquest experiments, es va emprar base de medi DMEM (Sigma), que no conté glucosa, piruvat ni glutamina. El piruvat i la glutamina eren afegits a la dissolució de medi inicial, per assolir la concentració final que es té en el medi estàndard ( 0,055 g/l de piruvat sòdic i 0,365 g/l de L-glutamina). S'afegia al medi [1]-<sup>13</sup>C-glucosa (Cambridge Isotopes, Regne Unit) per assolir una concentració final de 3,51 g/l. La dissolució final era tractada com el medi estàndard, tal i com es descriu a l'apartat 3.2.1. Les cèl·lules per experiments de marcatge es van cultivar només en flascons de 500  $cm^2$  per obtenir extractes cel·lulars. Els experiments de marcatge van ser de dos tipus.

1. **Marcatge de 24 hores:** el dia 3 de cultiu, el medi de les cèl·lules era canviat per medi DMEM [1]-<sup>13</sup>C-glucosa. Les cèl·lules es mantienien en cultiu amb aquest medi durant 24 hores, i eren recollides tal i com s'indica a l'apartat 3.2.1.2.
2. **Marcatge de 48 hores:** les cèl·lules eren mantingudes en condicions estàndard de cultiu fins el dia 5. Llavors, el medi era substituït per medi DMEM [1]-<sup>13</sup>C-glucosa i les cèl·lules eren mantingudes en cultiu fins el dia 7, quan eren recollides tal i com es descriu a l'apartat 3.2.1.2.

### 3.2.2.3 Cultiu de cèl·lules per detecció d'apoptosi

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous en cobreobjectes circulars de 10 mm de diàmetre. La proporció de volum de medi i el nombre inicial de cèl·lules sembrades no es va modificar respecte de la resta d'experiments.

### 3.2.2.4 Inducció d'apoptosi

Es va induir apoptosi en cèl·lules de dia 6 de cultiu com a control positiu d'apoptosi. La inducció es va dur a terme afegint staurosporina (Sigma) (Kabir *et al.*, 2002) al medi de cultiu a una concentració final d' $1\mu\text{M}$  i incubant les cèl·lules durant 15 hores en condicions estàndard abans de la seva tripsinització.

### 3.2.3 Corba de creixement de les cèl·lules C6 ATCC

La corba de creixement per les cèl·lules C6 ATCC es va caracteritzar en cèl·lules crescudes en flascons de  $75\text{cm}^2$  mesurant el nombre de cèl·lules en cultiu durant 9 dies a intervals de 24 hores. El nombre de cèl·lules i la seva viabilitat es van comptar per triplicat per cadascuna de les tres mostres obtingudes per cada punt. El comptatge de les cèl·lules es va realitzar per tinció amb el colorant vital *Trypan Blue* (Sigma), al qual són impermeables les cèl·lules viables. De cada mostra, es prenia una alíquota d'unes  $10^5$  cèl·lules i es barrejava amb *Typan Blue* en PBS a una concentració

final de 0,125% pes/volum . La mostra era col·locada en una cambra de Neubauer i es comptava el nombre de cèl·lules viables. Les dades obtingudes es van ajustar a una corba sigmoide exponencial amb el programa SigmaPlot 2002 8.0 per Windows (SPSS Inc., EUA).

Per les cèl·lules incubades amb ACSF, la corba es va obtenir durant 7 dies, i el dia 5 el medi es va substituir per ACSF en la mateixa proporció volum/superfície que el medi DMEM estàndard. La resta de l'experiment va ser idèntic al realitzat amb cèl·lules en condicions estàndard.

### 3.3 Microscòpia òptica (MO)

Els experiments de microscòpia òptica es van dur a terme al Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació d'Electroforesis, Autoradiografies i Luminescència (LAFEAL) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Es va emprar un microscopi Leica Qwin 500 (Wetzlar, Alemanya) equipat amb una càmera Leica DC200, emprant el programa Leica DCviewer versió 3.2.0.0 (Leica Microsystems, Alemanya). Per l'observació de les mostres, 10  $\mu$ l de mostra eren col·locats en un portaobjectes, i es cobrien amb un cobreobjectes. Primerament, la mostra era observada a 40 augments en contrast de fases, per assegurar-ne la integritat, i finalment s'observava a 100 augments, emprant oli d'immersió, i s'obtenien les fotografies corresponents en contrast de fase i fluorescència.

#### 3.3.1 Tinció de gotícules lipídiques

Per la tinció de les cèl·lules es va emprar com a colorant el compost *Nile Red* (9-dimetilamino-5H-[alfa]fenoxacina-5-ona). Aquest compost s'ha descrit anteriorment per la localització i quantificació de lípids, concretament lípids neutres dins de cèl·lules (Greenspan *et al.*, 1985). Es tracta d'un heterocicle sense càrrega que és soluble en

solvents orgànics i en lípids, però insoluble en aigua, i que actua com a sonda hidrofòbica, ja que el seu màxim de fluorescència varia depenent de la hidrofobicitat del seu entorn. Si es treballa a longituds d'ona d'excitació entre 450 i 500 nm i d'emissió de més de 528 nm, s'observa una fluorescència groc-daurada (*yellow-gold fluorescence*) que correspon als lípids neutres; si es treballa a 515-560 nm de longitud d'ona d'excitació i 590 nm d'emissió, s'observa una fluorescència vermella, corresponent als fosfolípids, altres lípids amfipàtics i als dominis hidrofòbics de les proteïnes de membranes cel·lulars. Per tant, per estudiar la presència de gotícules lipídiques cal treballar en les condicions d'observació de la fluorescència groc-daurada.

Per la preparació de les mostres, aproximadament  $10^6$  cèl·lules tripsinitzades com es descriu a 3.2.1.1 es tenyien directament amb *Nile Red* (Sigma) a una concentració final de  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$  del colorant fluorescent en PBS ( $990 \mu\text{l}$  PBS i  $10 \mu\text{l}$  d'una solució stock de *Nile Red* a  $10 \text{mg}/\text{ml}$  en acetona) durant 5 min. Les cèl·lules es centrifugaven, el sobrendant era eliminat, i l'excés de *Nile Red* es rentava amb 1ml de PBS. El pellet final es resuspensia en  $100 \mu\text{l}$  de PBS fresc. Les mostres es van mantenir en la foscor fins l'observació, que es va fer excitant la mostra a 510 nm i recollint l'emissió a 580 nm amb un filtre de fluroesceïna.

Per l'obtenció de la corba d'aparició de gotícules, es van considerar cèl·lules positives aquelles que presentaven dues o més gotícules citosòliques en ser observades. Per cada mostra, un mínim de 100 cèl·lules van ser observades, i es van estudiar un mínim de tres mostres diferents per cada punt de la corba de creixement. Per cèl·lules incubades amb ACSF es va estudiar l'aparició de gotícules en les cèl·lules durant els dies de tractament, és a dir, dies 6 i 7 de cultiu.

### 3.3.2 Mesures de volums cel·lulars i de volums de gotícules

Les mesures de diàmetre de cèl·lules, nuclis i gotícules lipídiques es va realitzar pel mètode dels diàmetres ortogonals en cèl·lules positives per la tinció amb *Nile Red*,



emprant el programa LeicaQwin (Standard v.2.3) de *Leica microsystems imagen solutions* (1998) (Leica Microsystems, Alemanya) al LAFEAL. El programa es va calibrar de manera que un pixel equivalgués a  $0,111 \mu m$ , que és la resolució de treball, i la màxima que permetia el nostre sistema.

### 3.3.3 Mesures del percentatge d'apoptosi

Les mesures del percentatge d'apoptosi es van fer per tinció amb DAPI de les cèl·lules sembrades en cobreobjectes segons la secció 3.2.2.3. El DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindole (Kapuscinski, 1995) és un colorant fluorescent que s'uneix fortament a l'ADN i produeix, quan s'excita a 360 nm, una fluorescència blava, ja que emet a 460 nm quan es troba unit a l'ADN. El DAPI pot travessar la membrana cel·lular, per tant es pot emprar per tenyir cèl·lules vives i fixades i ha estat àmpliament emprat com a colorant en la detecció d'apoptosi (Collins *et al.*, 1997; Al-Saffar *et al.*, 2002).

Els experiments de tinció amb DAPI es van fer en cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu ( $n = 3$ ), de dia 7 incubades amb ACSF ( $n = 3$ ) i tractades amb staurosporina ( $n = 3$ ). Després de cada tractament, les cèl·lules van ser rentades 2 vegades amb PBS, i es van fixar en p-formaldehid al 3% v/v durant 20 min a temperatura ambient. Les cèl·lules van ser rentades de nou 2 vegades amb PBS i bloquejades amb 0,5 % de BSA durant 30 min a temperatura ambient. Finalment, els cobreobjectes es van muntar en un portaobjectes utilitzant medi de muntatge que contenia DAPI (Vectashield, Vector Labs., EUA) i es van observar al microscopi. Les cèl·lules van ser considerades apoptòtiques quan s'observava al microscopi fragmentació i agregació de la cromatina nuclear.

### 3.4 Citometria de flux i cicle cel·lular

Cèl·lules de dia 4 de cultiu (n=3), de dia 7 de cultiu (n=3), de dia 7 incubades amb ACSF (n=3) i de dia 7 tractades amb staurosporina (n=3) es van desenganxar emprant una solució que contenia 0,54 mM EDTA, 154 mM NaCl and 10mM Hepes a pH 7,3 i es van con. Les cèl·lules es van centrifugar i es va afegir al pellet 0,5 ml de PBS refredat en gel. La fixació de les cèl·lules es va dur a terme per addició de 4,5 ml d'etanol 70 % amb agitació. Les mostres es van guardar a 4 °C durant un mínim de 30 min, i es van centrifugar 5 min a 300 g i 4 °C. El sediment cel·lular es va incubar en 0,5 ml d'una solució que contenia 50 µg/ml de iodur de propidi i 0,2 mg/ml d'RNAsa A durant 2 h a temperatura ambient. Les cèl·lules es van analitzar en un citòmetre Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) a l'Institut de Neurociències (UAB). L'anàlisi del cicle cel·lular es va fer emprant el programa ModFit (Institut d'Investigació en Ciències de la Salut "Germans Trias i Pujol", Badalona, Espanya).

### 3.5 Extractes lipídics cel·lulars

Els extractes lipídics es van obtenir essencialment com es descriu a Folch i col·laboradors (Folch *et al.*, 1957). Es van obtenir extractes de cèl·lules C6 en diferents condicions de cultiu. Les cèl·lules eren tripsinitzades com es descriu a l'apartat 3.2.1. El pes fresc final del sediment era determinat per diferència entre el tub buit i el tub contenint el sediment cel·lular final. Un cop obtingut, el sediment cel·lular era posat en suspensió en una barreja de cloroform:metanol (2:1) refredat en gel en proporció 20 ml/ g sediment cel·lular, i mantingut durant 30 min en el gel. La barreja era transferida a un matràs aforat que es guardava a 4 °C en atmosfera de N<sub>2</sub> gas durant un mínim de 12 hores. Passat aquest temps, l'extracte era filtrat a una proveta amb un filtre de paper. Les restes sòlides es rentaven 2 vegades amb 1 ml de

cloroform:metanol (2:1) i el rentat s'unia al filtrat. S'afegia clorur càlcic ( $\text{CaCl}_2$ ) a la proveta en una proporció 6 ml/g pellet, es barrejava amb una pipeta Pasteur i es deixava que se separessin les dues fases del sistema d'extracció durant 2 hores. Passat aquest temps, la fase superior aquosa era eliminada, i s'afegia a la proveta 1 ml d'una solució cloroform:metanol: $\text{CaCl}_2$  0,05% pes/volum en proporcions 3:48:47 en volum. Aquest procés era repetit 2 vegades més. En cada cas, la fase superior aquosa era separada de la fase inferior orgànica, on es troben els lípids a extraure, i eliminada. També era eliminada la fase intermèdia que es formava, que contenia bàsicament proteïnes (Folch *et al.*, 1957).

La fase orgànica que s'obtenia en el darrer pas era evaporada sota corrent de  $N_2$ , evitant que l'extracte s'assequés completament. El sediment final era redissolt en 500  $\mu\text{l}$  de cloroform i congelat a  $-80^\circ\text{C}$ . En tot el procés no s'emprà mai material de plàstic, per evitat les contaminacions que podria produir.

### 3.6 Quantificació de proteïna

La proteïna era quantificada sobre els sediments obtinguts per extracció àcida de les cèl·lules amb àcid perclòric (PCA) pel mètode de Lowry, tal i com es descriu a Valverde i col·laboradors (Valverde *et al.*, 2006).

### 3.7 Cromatografia en capa prima (TLC)

La cromatografia de capa prima és una tècnica de separació que es basa en la diferència d'afinitats d'un compost per les fases del sistema cromatogràfic (Christie, 1973). La mostra és aplicada sobre la fase estacionària, i aquesta es col·loca en contacte íntim amb la fase mòbil, la qual ascendeix per capil·laritat per la fase estacionària. La fase mòbil provoca el desplaçament de la mostra sobre la fase estacionària que depèn de la seva afinitat per una o altra fase. El compost s'aturarà sobre la fase

estacionària en aquella posició en què les forces d'atracció exercides per les dues fases s'igualin. La posició relativa respecte del front en què trobem un compost en un determinat sistema cromatogràfic és característic del compost. Es va triar com a mètode de quantificació la cromatografia en capa prima ja que és un mètode selectiu, sensible i consistent (Christie, 1990; Christie & Dobson, 1999) que presenta avantatges respecte d'altres mètodes, com per exemple els *kits* enzimàtics, degut a la seva major sensibilitat.

Per la separació de lípids neutres, es va emprar com a eluent una barreja de n-hexà/dietilèter/àcid acètic (J.T.Baker, Holland) en proporcions 80:20:2 en volum (Litchfield, 1972). D'aquesta solució es preparaven 102 ml. La barreja s'agitava i era transferida a una cubeta de cromatografia revestida amb paper de filtre. La cubeta es tancava i es deixava que es creés una atmosfera d'eluent durant un mínim de 30 min. Aquest procediment era repetit diàriament, ja que l'evaporació dels solvents provoca canvis en les seves concentracions i, per tant, variacions en la separació dels components de les mostres.

Les mostres eren aplicades en un suport de sílica sobre alumini de 20 × 20 cm (Merck, Alemanya), a una distància d'1,5 cm de la base, emprant una xeringa Hamilton (Aldrich, EUA) (5 o 25  $\mu$ l). L'aplicació es feia dipositant gotes de mostra al llarg d'una distància d'1 cm i deixant una separació entre mostres d'1 cm. Per evitar difusió, després de cada aplicació la mostra era assecada amb aire calent.

Un cop aplicades les mostres, la capa prima es col·locava dins la cubeta, de manera que la zona d'aplicació de mostres fos la més propera a l'eluent, però sense submergir-hi les mostres. Els eluent es deixaven ascendir per la fase estacionària fins a recórrer unes  $\frac{3}{4}$  parts de la capa prima. Es retirava amb unes pinces la capa prima de la cubeta i es deixava assecar a l'aire.

La tinció de les capes primes es va fer submergint la capa prima en una solució de *Coomassie Brilliant Blue*, mantenint el sistema en agitació durant 2 hores. La solució

de Coomassie era preparada per dissolució de 2,5 g de Brilliant Blue R (Sigma) en 450 ml d'aigua MilliQ, 450 ml metanol, i 100 ml d'àcid acètic, agitació i filtració. La destinció es feia submergint la capa prima en una dissolució de metanol 20 % en aigua MilliQ durant 10 min en agitació constant, dues vegades. Un cop tenyides, les capes primes es deixaven assecar a l'aire i s'estudiaven densitomètricament.

La densitometria es va realitzar al LAFEAL, emprant l'aparell Fluor-S MultiImager (BioRad, Espanya) i el programa QuantityOne version 41.1 Build 003. Aquest sistema, equipat amb un objectiu amb zoom, ens permetia obtenir una fotografia densitomètrica, aplicant filtre clar, llum blanca, epiluminació i alta resolució. El temps d'exposició variava entre 0,5 i 1 s. La fotografia obtinguda era analitzada amb el mateix programa. Els carrils d'aplicació de mostres es definien i es marcaven les bandes obtingudes, ajustant-ne l'amplada a 0,5 cm. La intensitat de la banda es calculava restant el soroll de fons i obtenint la densitat òptica de la banda.

### **3.7.1 Validació del mètode de quantificació per anàlisi d'estàndards i extractes**

Per posar a punt el mètode, es van emprar diferents estàndards dels compostos que es volien separar. Concretament es va treballar amb tripalmitin (Larodan, Suècia), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, palmitat de colesterol, colesterol i àcid palmític (Sigma) com a estàndards de triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), èsters de colesterol (EstCol), colesterol (Col) i àcids grassos lliures (AGL), respectivament.

Inicialment, es van realitzar diverses proves amb diferents mètodes d'aplicació, per comprovar la variació intrínseca del mètode. Aquestes proves es van realitzar amb dissolucions de tripalmitin en cloroform a diferents concentracions (entre 0,4 i 10 mg/ml) i aplicant volums diferents de mostra (5 o 25  $\mu$ l). També es va comprovar que el sistema cromatogràfic permetia la correcta separació i identificació dels components dels extractes fent capes primes d'extractes no destinats a la quantificació.

Per altra banda, es van obtenir rectes de calibratge per cadascun dels compostos a quantificar en els extractes cel·lulars (TAG, DAG i EstCol). Les rectes es van obtenir en l'interval de concentracions indicat per poder realitzar les quantificacions. Les rectes es van obtenir en les condicions òptimes de variació del mètode. Es van aplicar, en cada cas, 5  $\mu$ l de l'estàndard per triplicat a concentracions de 0,25, 0,5, 1 i 2 mg/ml, es van córrer i tenyir les capes primes i es van estudiar densitomètricament.

### 3.7.2 Extractes lipídics cel·lulars

Els extractes obtinguts per cèl·lules C6 en diferents condicions de cultiu es van aplicar per la quantificació de lípids neutres. Cada tipus de mostra (cèl·lules de dia 4 de cultiu, de dia 7 de cultiu i de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF) es va estudiar per separat. Els extractes es trobaven congelats a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En cada cas es van analitzar tres extractes dels quals es van aplicar en una mateixa capa prima 25  $\mu$ l per duplicat, obtenint sis aplicacions d'extractes per capa prima. A més es va obtenir una recta de calibratge interna de l'estàndard de lípid neutre a quantificar. Es van aplicar per duplicat 5  $\mu$ l de l'estàndard a concentracions 0,4 i 2 mg/ml. Degut a les variacions de soroll de fons causades pel procés de tinció, aquesta recta interna resulta imprescindible. Per tant, es van obtenir 9 cromatografies de capa prima, per cada tipus de mostra i per cada tipus d'estàndard. Cada capa prima va ser tenyida i estudiada per densitometria individualment.

## 3.8 Experiments d'espectroscòpia d'RMN

Els experiments d'RMN es van dur a terme al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear (SeRMN) de la UAB. L'espectròmetre emprat va ser el Bruker ARX-400 (Bruker SADIS, Wissembourg, France), equipat amb un imant de 9,4T i controlat amb una estació de treball Silicon Graphics I02 que treballa en entorn Xwindows

amb el programa X-winNMR. Es van emprar dos tipus de sonda per a tubs de 5 mm de diàmetre intern, segons l'experiment: una sonda broadband (BBI), amb geometria de bobines inversa i equipada amb gradients en l'eix z de fins a 0,5 T/ m; i una sonda QNP (*Quadruple Nuclear Probe*), que permet la detecció directa de  $^1\text{H}$  i dels heteronuclis  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{19}\text{F}$ , degut a la seva configuració de bobines directa.

En alguns casos, es va emprar l'espectròmetre Bruker Avance-500, equipat amb un imant de 10,5T, i controlat amb un ordinador que treballa en entorn Linux (Red Hat 7.3) que funciona amb el programa TopSpin. La sonda que es va utilitzar fou TBI (*Triple Broadband Inverse probe*) amb canals per  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ , un canal de banda ampla (X), amb la possibilitat de sintonitzar nuclis amb freqüència de ressonància entre 23,260 MHz ( $^{109}\text{Ag}$ ) i 202,404 MHz ( $^{31}\text{P}$ ), i amb configuració inversa, és a dir, la bobina de  $^1\text{H}$  és la més propera a la mostra, per tal d'optimitzar la sensibilitat en els experiments de detecció inversa. En cada experiment s'indica l'espectròmetre i la sonda emprats. A l'Annex s'inclouen les seqüències de polsos emprades.

La nomenclatura utilitzada en els paràmetres d'adquisició de les diferents seqüències de polsos emprades en l'espectròmetre ARX-400 és la següent:

- $d_1$ : interval de temps introduït per permetre la relaxació dels sistemes d'espín d'interès després d'haver-los sotmès a una seqüència de polsos.
- $d_2$ : interval de temps que determina el punt d'irradiació màxima en una seqüència d'eco d'espín precedida per un bloc de polsos *jump-and-return*.
- $d_3$ : interval de temps que permet l'evolució i reenfocament dels sistemes d'espín.
- DS: *dummy scans*, adquisicions de simulació. Aquestes adquisicions no formen part de la FID final, però permeten a la magnetització de la mostra arribar a un estadi estacionari abans de començar l'adquisició de dades.

- NS: *number of scans*, nombre d'adquisicions que se sumen per obtenir la FID final.
- $p_1, p_2 \dots$  polsos de radiofreqüència.
- $O_1$ : centre de l'espectre en la dimensió de  $^1\text{H}$ .
- $O_2$ : centre de l'espectre en la dimensió de  $^{13}\text{C}$ .
- SI: nombre de punts adquirits experimentalment.
- $T_r$ : temps de reciclatge, temps que transcorre des de l'aplicació del pols en una adquisició fins el primer pols de la següent.
- TD: nombre de punts emprats per digitalitzar la FID.

### 3.8.1 Preparació de mostres

Essencialment es van obtenir espectres d'RMN de dos tipus de mostres: cèl·lules intactes i extractes lipídics.

- **Mostres de cèl·lules intactes:** el processament de la mostra era el que es descriu a l'apartat 3.2.1.2.
- **Mostres d'extractes lipídics:** els extractes eren descongelats i evaporats sota corrent de  $N_2$ . El sediment era rentat amb  $500 \mu\text{l}$  de cloroform deuterat, evaporat de nou i redissolt en  $375 \mu\text{l}$  de cloroform deuterat: metanol deuterat en relació 2:1 v/v. Posteriorment, cada extracte era transferit a un tub d'RMN de 5 mm de diàmetre extern i s'afegien  $75 \mu\text{l}$  de  $D_2O$  i  $75 \mu\text{l}$  de  $K_2EDTA$  0,2 M a pH 6, obtenint dues fases en la mostra. Està descrit a la bibliografia que la presència d'EDTA en la fase superior aquosa millora l'amplada de banda de les ressonàncies dels espectres, especialment els de  $^{31}\text{P}$  (Meneses & Glonek, 1988). Finalment, s'introduïa en el tub un insert concèntric (Wilmad, EUA) per tubs



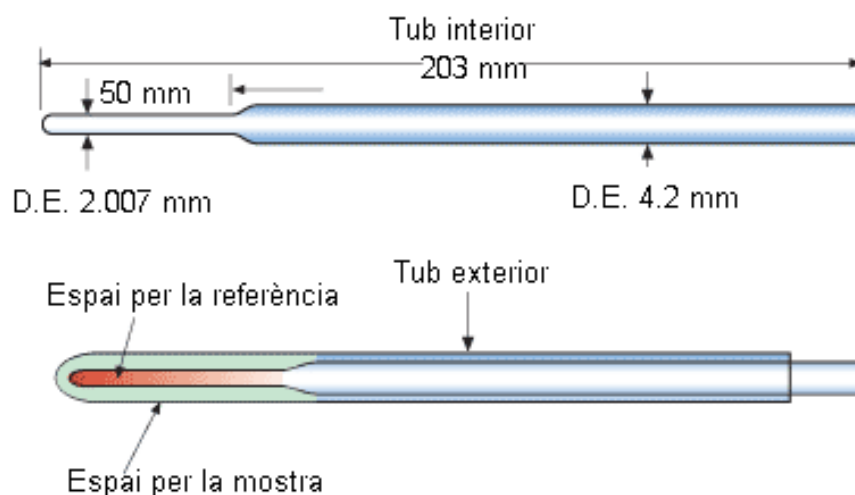


Figura 3.1: Insert per augmentar el volum aparent de mostra (Catàleg Wilmad, EUA)

de 5 mm, com el que es mostra a la figura 3.1, amb un diàmetre extern de 2 mm a la part més estreta, amb un volum màxim de  $60\mu\text{l}$ , que contenia cloroform deuterat: metanol deuterat (2:1 v/v), per augmentar el volum aparent de la mostra. Com a estàndard de desplaçament químic es va emprar el senyal del  $\text{CHCl}_3$  residual a 7,27 ppm en els espectres de  $^1\text{H}$  i del  $\text{CDCl}_3$  a 77,0 ppm en els espectres de  $^{13}\text{C}$ .

Cal tenir en compte que la baixa concentració dels compostos a estudiar en les nostres mostres feia imprescindible l'absència total de possibles contaminants i interferències provinents del procés de preparació de la mostra. Per això es van analitzar curosament les diferents qualitats comercials dels dissolvents a emprar i es van seleccionar els de més alta puresa.

### 3.8.2 Experiments d'RMN monodimensional

#### 3.8.2.1 Experiments de $^1\text{H}$ -RMN

Els experiments de  $^1\text{H}$  1D-NMR es van obtenir a  $37^\circ\text{C}$ , en el cas de cèl·lules, i a  $25^\circ\text{C}$  en els altres casos, en els espectròmetres Bruker Avance-500 10,5T i ARX-400 9,4T, emprant una sonda BBI per a tubs de 5 mm. Es van realitzar experiments de  $^1\text{H}$  tant

de cèl·lules intactes com d'extractes lipídics. Els experiments realitzats van ser de dos tipus, segons la seqüència emprada:

- **Seqüència de pols i adquisició ( $90^\circ$  - acqu).**

Els experiments de pols i adquisició consisteixen en una presaturació del senyal de l'aigua, per irradiació intensa sobre aquest senyal (4,75 ppm en el nostre cas), un pols de  $90^\circ$  i l'adquisició de la FID corresponent. El pols de  $90^\circ$  va ser d'entre 6,5 i 7,5  $\mu s$ , depenent de la mostra a estudiar, es van obtenir 64 adquisicions, que es van sumar per obtenir la FID final. El TD va ser de 16K, igual que el nombre de punts adquirits experimentalment. En les mostres de cèl·lules, el senyal de l'aigua residual (HDO principalment) és molt intens, per això es va suprimir aquest senyal emprant un pols de presaturació (2 s, 0,05mW). El temps de cada adquisició fou d'1,57 s i el temps de reciclatge de 5 s. En les mostres d'extractes i estàndards els dissolvent són cloroform i metanol deuterats, per tant no era necessària la presaturació. El temps de cada adquisició fou d'1,57 s i el temps de reciclatge de 5 s.

- **Seqüència d'spin-echo ( $90^\circ$  - $\tau$ - $180^\circ$  - $\tau$ -acqu )**

Es va emprar una seqüència d'eco d'espin modificada per millorar la supressió de l'aigua. Es va introduir en la seqüència la presaturació de l'aigua al principi de l'experiment, i el pols de  $90^\circ$  es va substituir per una seqüència *jump-and-return* (JR). El JR consisteix en dos polsos de  $90^\circ$  de fase oposada, separats per un temps  $d_2$ , de manera que s'exciten totes les ressonàncies, excepte la de l'aigua. D'aquesta manera, s'aconsegueix una supressió millor del pic de l'aigua que si s'empra únicament un dels mètodes. Quan s'empra aquesta seqüència cal tenir en compte dos efectes: la modulació de la fase i el punt de màxima irradiació, que comporta un pols d'excitació variable al llarg del rang espectral d'interès.

Per una banda, les seqüències d'eco d'espín provoquen una modulació de la fase en aplicar un pols de  $180^\circ$  quan hi ha acoblament homonuclear. La fase dels senyals que es vulguin modular depèn de la constant d'acoblament  $J$  i del temps d'eco  $T_e$ , que és el doble del valor del temps que transcorre entre el segon pols de  $90^\circ$  i el pols de  $180^\circ$ . En el nostre cas, ens interessava poder separar en el senyal al voltant d'1,24 ppm el doblet del metil del lactat del senyal dels metilens dels lípids. Per valors de  $\tau = \frac{T_e}{2} = \frac{1}{2J}, \frac{3}{2J}, \frac{5}{2J} \dots$  el doblet del lactat sortirà invertit en l'espectre, de manera que serà distingible del senyal positiu dels metilens dels lípids, que no es modula ja que no presenta acoblament. El valor de  $\tau = d_3$  es va fixar en 68 ms, obtenint un  $T_e$  de 136 ms.

Per altra banda, calia aconseguir que el màxim d'irradiació es trobés sobre el senyal a 1,24 ppm, i el nul d'irradiació es trobés sobre el senyal de l'aigua (4,75ppm). El perfil d'excitació de la seqüència JR està modulats per una expressió del tipus  $\sin \omega t_{max}$ , on  $t_{max}$  és el temps entre els dos polsos de  $90^\circ$  del JR. El valor de  $t_{max}$  es calcula amb la següent expressió:

$$t_{max} = \frac{1}{4\omega} \quad (3.1)$$

on  $\omega$  és la velocitat angular de la magnetització en el pla x-y. Si convertim l'expressió obtenim:

$$t_{max} = \frac{1}{4 \cdot cf \cdot (\delta_{max} - \delta_{O1})} \quad (3.2)$$

on  $cf$  és la freqüència portadora, en el nostre cas 400,13Hz/ppm,  $\delta_{max}$  és el desplaçament del senyal d'irradiació màxima, és a dir 1,24 ppm en el nostre cas (senyal del lactat), i  $\delta_{O1}$  és el desplaçament del senyal d'irradiació nul·la, és a dir 4,75 ppm en el nostre cas (senyal de l'aigua). D'aquesta manera el valor de  $d_2 = t_{max} = 184$  ms.

Els paràmetres d'adquisició van ser els següents: pols de  $90^\circ$   $p_1 = p_2 = 6,5-7,5 \mu s$ ; pols de  $180^\circ$   $p_3 = 13-15 \mu s$ ; NS = 256; la supressió de l'aigua es va aconseguir aplicant durant 1,5 s una potència de 0,05 mW; el TD va ser de 8 K, a l'igual que el nombre de punts experimentals. El temps d'adquisició va ser de 4,063 s i el  $d_1$  de 2,5 s.

### 3.8.2.2 Experiments de $^{13}\text{C}$ -RMN

Els experiments de  $^{13}\text{C}$  1D-NMR es van obtenir a  $37^\circ\text{C}$  en l'espectròmetre Bruker ARX-400 9,4T (SeRMN, UAB), emprant una sonda QNP (*Quadruple Nuclear Probe*). Es va emprar una seqüència de detecció de  $^{13}\text{C}$  amb desacoblament de  $^1\text{H}$ , mantenint el NOE, i aplicant un pols d'excitació de  $30^\circ$ . El desacoblament s'aconseguia amb un WALTZ al principi de la seqüència. Els paràmetres emprats en l'adquisició d'espectres d'extractes van ser: NS = 12288, DS = 2, pols de  $90^\circ$   $p_1 = 10,5 \mu s$ ;  $d_1 = 1 s$ ; temps d'adquisició de 1,1141 s; SI = 32 K i TD = 64 K. Els experiments tenien una duració total de 26 h. Per les mostres d'estàndards, els paràmetres es mantenien, excepte el nombre d'enregistraments, que era NS = 256, reduint a 20 min el temps total d'adquisició.

### 3.8.3 Experiments d'RMN bidimensional

#### 3.8.3.1 Experiments $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY

Es van obtenir espectres de correlació homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  per la caracterització dels estàndards. Aquests experiments es van realitzar en un espectròmetre Bruker ARX-400 9,4T (SeRMN, UAB), emprant una sonda BBI per a tubs de 5 mm a  $37^\circ\text{C}$ . La seqüència emprada va ser una cosy gr, amb gradients de camp magnètic. Els paràmetres espectrals van ser: NS 16;  $p_1$   $6 \mu s$ ; nombre d'increments 256; el temps d'adquisició va ser de 0,106 s per la primera dimensió i 0,02 s per la segona dimensió, i el temps de reciclatge va ser de 1,126 s.

### 3.8.3.2 Experiments $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC

Els experiments d'RMN bidimensional heteronuclears es van obtenir a 37 °C en l'espectròmetre Bruker ARX-400 9,4T (SeRMN, UAB), emprant una sonda BBI per a tubs de 5 mm.

Es van realitzar experiments d'espectroscòpia bidimensional heteronuclear de detecció inversa. Aquest tipus d'experiments permeten la detecció de nuclis de baixa sensibilitat (com  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ ) a través de nuclis d'alta sensibilitat ( $^1\text{H}$ ). Les seqüències estan dissenyades per detectar únicament les interaccions  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Es va escollir la seqüència HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) pels nostres experiments ja que presenta els avantatges de ser poc sensible a imperfeccions en els polsos i ser sensible a la fase. Altres seqüències similars són molt sensibles a imperfeccions en els polsos, com per exemple la seqüència HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), o presenten poca sensibilitat degut a la seva durada, com la seqüència HMBC que a més permet obtenir només espectres en mode magnitud. Els experiments HMQC tenen, però, el desavantatge que detecten els acoblaments  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , que per la resolució espectral en F1 ( $^{13}\text{C}$ ) no són visibles, però donen lloc a un eixamplament dels senyals, fent que els espectres obtinguts no siguin directament quantificables. Tot i això, es va decidir que pels nostres objectius era la millor opció.

Les mostres estudiades per HMQC van ser els extractes lipídics de les cèl·lules C6. La preparació de les mostres ja ha estat descrita anteriorment a l'apartat 3.8.1. Els paràmetres espectrals van ser: nombre d'enregistraments per F2 ( $^1\text{H}$ ) 296, nombre d'increments per F1( $^{13}\text{C}$ )= 256, pols de 90° per  $^1\text{H}$ = 6,5 $\mu\text{s}$ ; pols de 90° per  $^{13}\text{C}$ = 10,5  $\mu\text{s}$ ;  $d_1 = 1$  s; el temps d'adquisició fou de 0,21 s per F2 i de 0,007s per F1.

### 3.9 Anàlisi estadística de les dades

Es va emprar el programa SPSS 11.5 per Windows (SPSS Inc., EUA). Es va aplicar un test de Mann-Whitney, test no paramètric per 2 variables independents, per comparar els resultats entre els experiments realitzats en diferents moments de la fase de creixement de les cèl·lules. El nivell de significació estadística es va fixar en  $p \leq 0.05$ .

En els casos en què es van realitzar càlculs amb dades experimentals, es va tenir en compte la propagació d'errors, i es van seguir les regles matemàtiques bàsiques, segons es descriu a (Rice, 1995).

# Resultats i discussió

## 4.1 Cultiu, experiments de microscòpia òptica i citometria de flux de cèl·lules C6

### 4.1.1 Experiments d'optimització de la corba d'aparició de gotícules en cèl·lules C6 ECACC i ATCC

El percentatge de cèl·lules en fase exponencial que presentaven gotícules per observació per microscòpia òptica disminuïa al disminuir el nombre de cèl·lules sembrades inicialment i en augmentar el volum de medi (taula 4.1). Aquests canvis permetien obtenir una corba d'aparició de gotícules reproducible, aconseguint un mínim en el nombre de cèl·lules positives en fase exponencial, i maximitzant la variació del percentatge de cèl·lules amb gotícules entre fase exponencial, confluent i postconfluent de la corba de creixement. Es va comprovar per RMN que la intensitat del senyal de ML augmentava entre cèl·lules exponencials i postconfluents en un factor d'aproximadament 8.

Les condicions de tripsinització 2 i 3 (veure 3.1.2) permetien maximitzar la diferència de percentatge de cèl·lules amb gotícules entre la fase exponencial, 24 h

| nº sembrades/cm <sup>2</sup> | cèl·lules/cm <sup>2</sup> | volum de medi (ml/cm <sup>2</sup> ) | percentatge de cèl·lules positives |
|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 15000                        |                           | 0,2                                 | 97 ±3 (n= 707)                     |
| 8000                         |                           | 0,2                                 | 67,5±<br>8,3(n= 319)               |
| 8000                         |                           | 0,35                                | 48,5 ± 2,5<br>(n= 318)             |
| 8000                         |                           | 0,5                                 | 31,5 ± 1,5<br>(n= 322)             |

Taula 4.1: Efecte de les variacions de les condicions de cultiu en cèl·lules C6 ECACC en fase exponencial tripsinitzades per la condició 1 (5 dies de cultiu, subconfluència *de visu*).

després de la ressebra, i la fase postconfluent. Així, la condició 2 permetia obtenir un 33% de cèl·lules positives i la condició 3 un 45%. De tota manera, es va optar per modificar únicament el nombre de cèl·lules inicialment sembrades i el volum de medi, ja que així s'assolia l'objectiu d'obtenir unes condicions reproduïbles d'aparició de gotícules al llarg de la corba de creixement de les cèl·lules C6, i mantenir la condició 1 per la tripsinització. Les condicions finals de cultiu van ser 8000 cèl·lules/cm<sup>2</sup> i 0,5 ml de medi/cm<sup>2</sup>, que es van considerar les estàndard per la resta d'experiments.

Donat que el repositori europeu (ECACC) no facilitava el nombre de passatges de les cèl·lules C6 quan van ser dipositades, es va preferir continuar els experiments amb cèl·lules C6 del repositori americà (cèl·lules ATCC subcultiu 64 en un primer lot, 37 en un segon lot) mantenint les condicions de cultiu optimitzades per les cèl·lules C6 ECACC.

#### 4.1.2 Cultiu de cèl·lules C6 ATCC

Es va obtenir la corba de creixement de les cèl·lules C6 ATCC en condicions estàndard de cultiu (figura 4.1, cercles plens). Les cèl·lules assoleixen la fase exponencial a dia 3 de cultiu, la fase confluent a dia 5 de cultiu, i a dia 7 es troben a densitat de saturació. Les cèl·lules es van ressebrar rutinàriament el dia 5 de cultiu. La viabi-



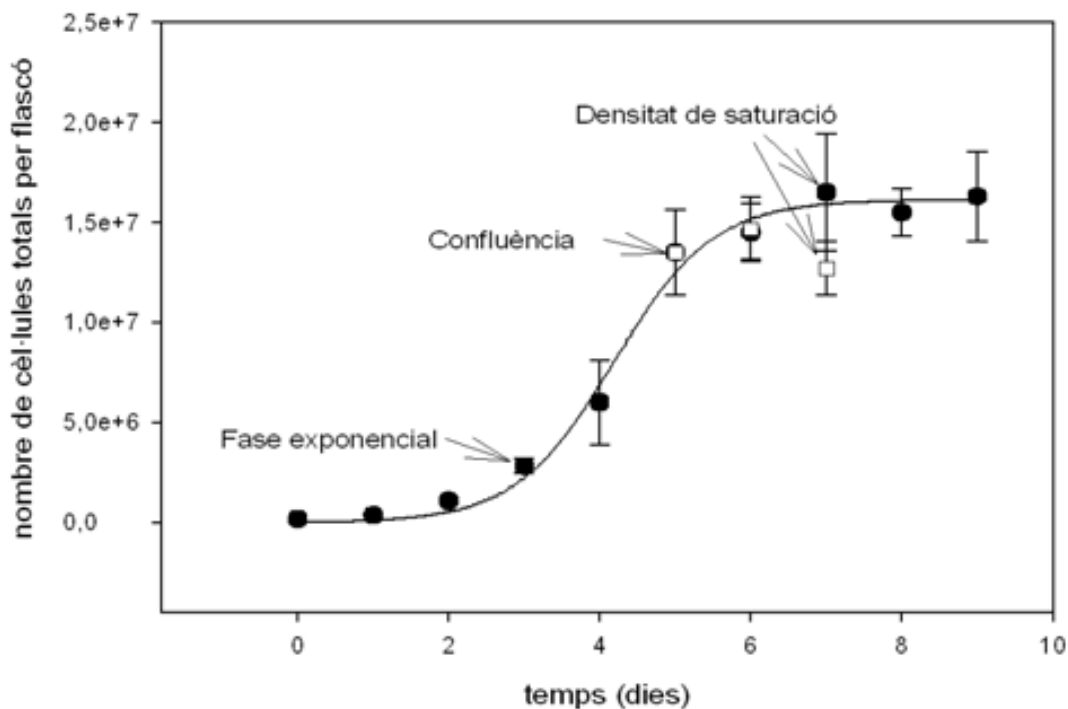


Figura 4.1: Corba de creixement de les cèl·lules C6. Les barres mostren la desviació estàndard, excepte en els casos que la barra sigui més petita que el símbol. Els cercles plens (●) representen la corba per les cèl·lules crescudes en medi DMEM. Els quadrats buits (□) representen els valors per les cèl·lules incubades amb ACSF.

litat cel·lular mesurada amb *Trypan Blue* el dia 7 de cultiu va ser sempre superior al 92% per les cèl·lules crescudes en medi DMEM.

Per les cèl·lules incubades amb ACSF (figura 4.1, quadrats buits), s'assoleix a dia 7 un nombre inferior de cèl·lules que en el cas de les cèl·lules crescudes amb medi DMEM, d'acord amb una aturada de la proliferació a partir de l'inici de la incubació el dia 5 de cultiu, tot i que no és una variació estadísticament significativa. Per cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF, la viabilitat cel·lular va ser del 75%. El temps de duplicació per les cèl·lules C6 ATCC a la fase exponencial va ser de 18h. Les cèl·lules incubades amb  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa presenten una corba de creixement i una viabilitat idèntiques a les cèl·lules crescudes amb medi DMEM.

### 4.1.3 Microscòpia òptica (MO)

#### 4.1.3.1 Corba d'aparició de gotícules

Es van estudiar mostres de cèl·lules a cada punt de la corba de creixement fins a dia 7 per microscòpia òptica. Cada mostra era tenyida amb *Nile Red* i observada al microscopi. A la figura 4.2 s'observa que hi ha un augment en el nombre de cèl·lules positives el dia després de la ressebra (dia 1). Aquest percentatge va disminuint fins a dia 4, on es troba el mínim de cèl·lules positives ( $23 \% \pm 2,0 \%$ ). El valor a dia 5 no difereix del valor a dia 0, ja que en els dos casos són cèl·lules de dia 5, però en el cas de dia 0 les cèl·lules tripsinitzades es van emprar per fer ressebres. A partir de dia 4, el nombre de cèl·lules positives torna a augmentar fins a dia 7, en què obtenim el màxim de cèl·lules positives ( $60 \% \pm 9,3 \%$ ). Els dies 4 i 7 van ser escollits per la realització dels següents experiments, ja que s'esperava que proporcionarien el màxim rang dinàmic per l'estudi tant dels canvis en el contingut de TAG com dels canvis en els espectres de  $^1\text{H}$ . En el cas de les cèl·lules incubades amb ACSF, s'observa que tant a dia 6 com a dia 7 un 100% de cèl·lules són positives per la presència de gotícules.

La figura 4.3 mostra cèl·lules tenyides amb *Nile Red* en tres punts diferents d'estudi. Les gotícules lipídiques citosòliques tenyides, de color daurat, són visibles sobre un fons de tinció vermella de les membranes cel·lulars.

#### 4.1.3.2 Mesures de volums cel·lulars i de volums de gotícules

Les mesures es van realitzar sobre micrografies obtingudes amb anterioritat. Les mostres estudiades van ser cèl·lules de dia 4 i de dia 7 de cultiu en condicions estàndard, i cèl·lules de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF. Per cada tipus de mostra es va mesurar el diàmetre d'un mínim de 78 gotícules, i els diàmetres cel·lular i nuclear d'un mínim de 63 cèl·lules. Amb aquestes dades, es van calcular els volums

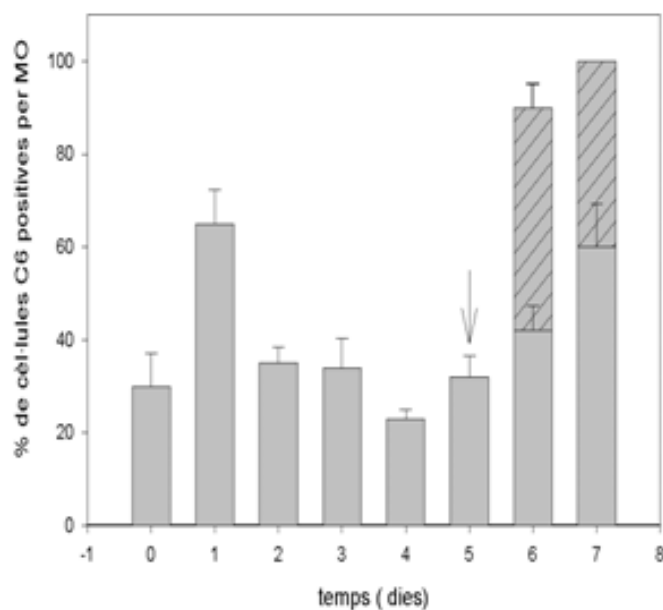


Figura 4.2: Histograma d'aparició de gotícules lipídiques en les cèl·lules C6. Les columnes grises indiquen les cèl·lules cultivades en medi DMEM. Les columnes ratllades indiquen les cèl·lules incubades amb ACSF. Les barres indiquen la desviació estàndard. La fletxa indica el dia de subcultiu. Es van realitzar un mínim de 3 replicats.

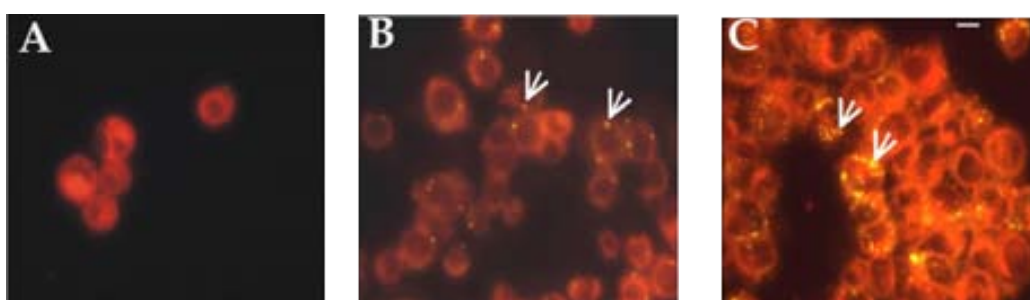


Figura 4.3: Cèl·lules C6 tenyides amb *Nile Red* i observades per microscòpia òptica d'epifluorescència a 100 augments. A- cèl·lules de dia 4 de cultiu, B- cèl·lules de dia 7 de cultiu, C- cèl·lules de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF. Les fletxes indiquen les gotícules lipídiques citosòliques de color daurat. La línia blanca a C medeix 10  $\mu\text{m}$ . Es va emprar la mateixa ampliació digital en els tres casos.

de gotícules, nuclis i cèl·lules, i es van poder determinar les característiques d'una cèl·lula promig en cadascun dels tipus de mostra estudiat. Tots els càlculs es van realitzar tenint en compte la propagació d'errors. La informació es troba recollida a la taula 4.2.

El volum nuclear no canvia significativament entre les cèl·lules de la fase exponencial de dia 4 de cultiu i les de fase de densitat de saturació de dia 7 de cultiu ( $0,62 \pm 0,41$  pl vs  $0,61 \pm 0,50$  pl) però el volum cel·lular incrementa significativament amb la corba de creixement ( $1,95 \pm 1,41$  pl vs  $5,66 \pm 3,52$  pl) d'acord amb dades prèvies del grup (Valverde *et al.*, 2006). Això significa que les cèl·lules de dia 7 de cultiu tenen un volum citoplasmàtic major que les cèl·lules de dia 4 ( $1,34 \pm 1,47$  pl vs.  $5,05 \pm 3,56$  pl). Per altra banda, les cèl·lules incubades amb ACSF presenten un volum cel·lular intermedi entre les cèl·lules de dia 4 i les de dia 7 ( $2,22 \pm 1,31$  pl), que és significativament inferior al volum de les cèl·lules de dia 7. El volum nuclear de les cèl·lules incubades amb ACSF no presenta diferències significatives respecte de les cèl·lules de dia 4 i dia 7 crescudes en medi DMEM ( $0,53 \pm 0,49$  pl).

Pel què fa a les gotícules lipídiques, tenen un diàmetre promig major ( $869 \pm 805 \times 10^{-6}$  pl vs.  $179 \pm 70 \times 10^{-6}$  pl) i són més abundants ( $3,9 \pm 1,9$  vs.  $2,2 \pm 1,1$ ) en les cèl·lules de dia 7 de cultiu que en les cèl·lules de dia 4 de cultiu. Per les cèl·lules de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF, que es troben en una situació d'aturada de proliferació cel·lular (veure 4.1.5), el volum de les gotícules lipídiques no canvia significativament respecte de les cèl·lules de dia 7 de cultiu ( $869 \pm 805 \times 10^{-6}$  pl vs.  $743 \pm 488 \times 10^{-6}$  pl), tot i que les cèl·lules incubades amb ACSF presenten un nombre de gotícules citosòliques significativament més alt ( $3,9 \pm 1,9$  vs.  $14,3 \pm 6,65$ ).

A partir dels resultats obtinguts es poden calcular les característiques d'una cèl·lula promig. En el cas d'una cèl·lula de dia 7 de cultiu tindria un volum cel·lular de  $5,66$  pl, un volum citoplasmàtic de  $5,05$  pl, un volum nuclear de  $0,61$  pl i  $3,9$  gotícules lipídiques amb un volum total de gotícules de  $3,43 \times 10^{-3}$  pl. Una cèl·lula promig

de dia 4 de cultiu tindria un volum cel·lular d'1,95 pl, un volum citoplasmàtic de 0,62 pl i 2,2 gotícules lípidiques, amb un volum total de  $0,39 \times 10^{-3}$ pl. Una cèl·lula promig de dia 7 de cultiu incubada amb ACSF tindria un volum cel·lular de 2,22 pl, un volum citoplasmàtic d'1,69 pl, i 14,3 gotícules lípidiques citosòliques, amb un volum total de  $10,63 \times 10^{-3}$  pl.

#### 4.1.4 Mesures del percentatge d'apoptosi per tinció amb DAPI i microscòpia de fluorescència

Els experiments de tinció amb DAPI van mostrar un percentatge de cèl·lules apoptòtiques del  $10 \pm 4\%$  en cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF, i d' un  $58 \pm 7\%$  en cèl·lules tractades amb staurosporina. No es van detectar cèl·lules apoptòtiques en els experiments de tinció de cèl·lules de dia 7 de cultiu. La figura 4.4 mostra cèl·lules tenyides amb DAPI observades per microscòpia òptica.

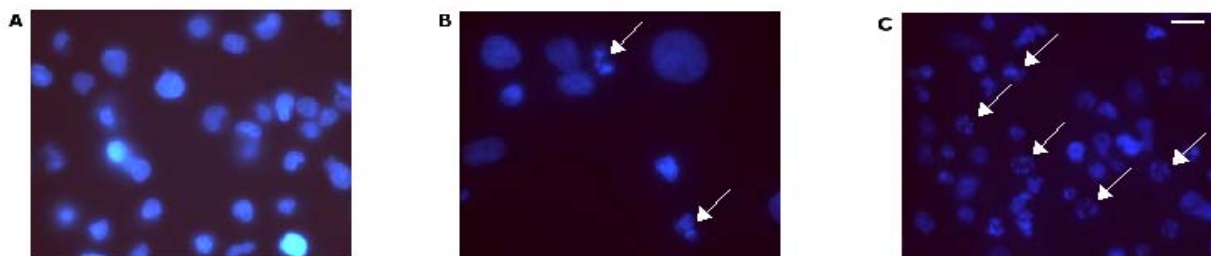


Figura 4.4: Cèl·lules tenyides amb DAPI observades per microscòpia òptica. A- cèl·lules de dia 7 de cultiu; B- cèl·lules de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF; C- cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina. Les fletxes indiquen cèl·lules apoptòtiques. La línia blanca a C medeix  $10 \mu m$ . Es va emprar la mateixa ampliació digital en els tres casos.

#### 4.1.5 Citometria de flux i cicle cel·lular

Els resultats, recollits a la taula 4.3, mostren que tant les cèl·lules de dia 7 com les incubades amb ACSF presenten un percentatge significativament superior de cèl·lules en fase G0-G1 que les cèl·lules de dia 4. El percentatge de cèl·lules en fase S és per

|  | cèl·lules de dia 4       | cèl·lules de dia 7       | cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF |
|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| diàmetre promig de les gotícules visibles per MO ( $\mu m$ )(n= nombre de gotícules mesurades)* <sup>§</sup> | 0,70 $\pm$ 0,23 (n= 78)  | 1,10 $\pm$ 0,31 (n= 163) | 1,08 $\pm$ 0,22 (n= 172)              |
| volum promig de cada gotícula( $10^{-6}$ pl)* <sup>§</sup>   | 179 $\pm$ 70 (n= 78)     | 869 $\pm$ 805 (n= 163)   | 743 $\pm$ 488 (n= 172)                |
| n gotícules per cèl·lula * <sup>§</sup> &  | 2,2 $\pm$ 1,1 (n= 363)   | 3,9 $\pm$ 1,9(n= 360)    | 14,3 $\pm$ 6,65 (n= 186)              |
| volum cel·lular (pl) * <sup>§</sup> &  | 1,95 $\pm$ 1,41 (n= 363) | 5,66 $\pm$ 3,52 (n= 360) | 2,22 $\pm$ 1,31 (n= 132)              |
| volum nuclear (pl)   | 0,62 $\pm$ 0,41 (n= 63)  | 0,61 $\pm$ 0,50 (n= 120) | 0,53 $\pm$ 0,49 (n= 89)               |
| volum citoplasmàtic (pl)* <sup>§</sup> &   | 1,34 $\pm$ 1,47 (n=63)   | 5,05 $\pm$ 3,56 (n=120)  | 1,69 $\pm$ 1,40 (n=89)                |
| volum total de gotícules en una cèl·lula promig( $10^{-3}$ pl) <sup>+</sup>                                  | 0,39 $\pm$ 0,28          | 3,43 $\pm$ 2,14          | 10,63 $\pm$ 8,55                      |
| volum de gotícules/ volum citoplasma en una cèl·lula promig ( $10^{-3}$ pl gotícula/pl citop.) <sup>+</sup>  | 0,29                     | 0,52                     | 6,27                                  |
| % ocupat pel nucli en una cèl·lula promig <sup>+</sup>   | 30,36                    | 11,22                    | 23,83                                 |

Taula 4.2: Mesures de diàmetres de cèl·lules i gotícules per microscòpia òptica, i els càlculs realitzats a partir de les dades obtingudes \* Diferències estadísticament significatives entre dia 4 i dia 7 & Diferències estadísticament significatives entre dia 7 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF <sup>§</sup> Diferències estadísticament significatives entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF <sup>+</sup> No es va realitzar anàlisi estadística, ja que són valors calculats. Els càlculs es van fer emprant el promig dels quocients enlloc del quocient dels promitjos.

contra significativament major en cèl·lules de dia 4 que en cèl·lules de dia 7 i incubades amb ACSF.

Les cèl·lules tractades amb staurosporina presenten un percentatge significativament menor de cèl·lules en fase G0-G1 que les cèl·lules en altres condicions. Pel que fa al pic subG0, indicador de fragmentació de DNA coherent amb la presència d'apoptosi (Al-Saffar *et al.*, 2002), el percentatge de cèl·lules en aquesta fase augmenta significativament de cèl·lules de dia 4 a cèl·lules de dia 7 i de dia 7 incubades amb ACSF, i augmenta encara més amb el tractament amb staurosporina.

La figura 4.5 mostra els histogrames de citometria de flux per la distribució de les cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular.

|                         | Cèl·lules de dia 4 (n=3) | Cèl·lules de dia 7 (n=3) | Cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF (n=3) | Cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina (n=3) |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---|--|
| Cèl·lules en fase G0-G1 | 62,7 ± 2,4               | 77,9 ± 3,7 <sup>a</sup>  | 81,0 ± 2,6 <sup>b</sup>                     | 37,2 ± 1,6 <sup>def</sup>                            |
| Cèl·lules en fase G2-M  | 13,9 ± 1,8               | 14,3 ± 4,0               | 3,6 ± 0,7 <sup>bc</sup>                     | 9,5 ± 1,8 <sup>df</sup>                              |
| Cèl·lules en fase S     | 20,9 ± 1,2               | 6,0 ± 0,6 <sup>a</sup>   | 5,1 ± 0,2 <sup>b</sup>                      | 17,4 ± 3,1 <sup>ef</sup>                             |
| Cèl·lules en fase subG0 | n.d.                     | 1,8 ± 0,3                | 10,3 ± 2,3 <sup>c</sup>                     | 36,1 ± 5,7 <sup>ef</sup>                             |

Taula 4.3: Mesures del percentatge de cèl·lules C6 en cada fase del cicle cel·lular en les diferents situacions estudiades. Diferències significatives entre: <sup>a</sup> cèl·lules de dia 7 i dia 4 <sup>b</sup> cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF i dia 4 <sup>c</sup> cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF i dia 7 <sup>d</sup> cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina i dia 4 <sup>e</sup> cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina i dia 7 <sup>f</sup> cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina i de dia 7 incubades amb ACSF n.d., no detectable. Nivell de significació  $p \leq 0,05$ .

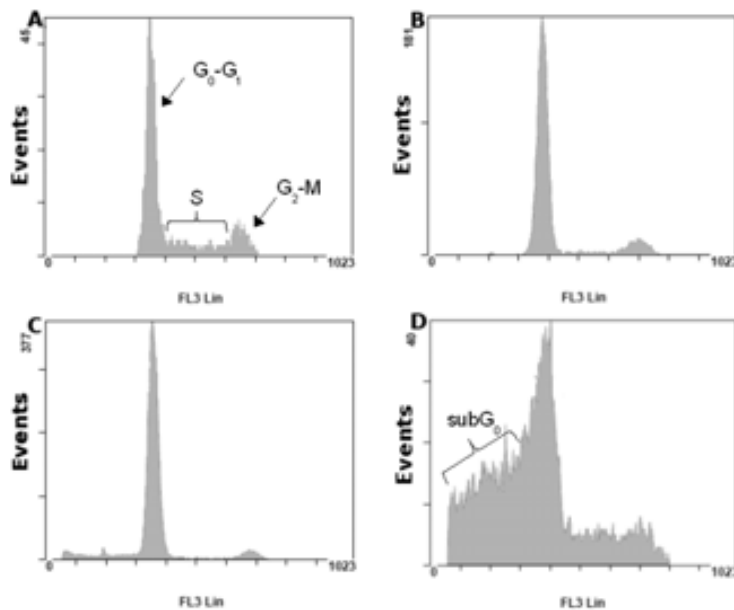


Figura 4.5: Histogrames obtinguts en els experiments de mesura de cicle cel·lular en cèl·lules C6 per citometria de flux: A-cèl·lules de dia 4; B-cèl·lules de dia 7; C-cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF; D-cèl·lules de dia 7 tractades amb staurosporina.

#### 4.1.6 Discussió dels resultats

Els experiments d'optimització de les condicions de cultiu realitzats van permetre obtenir unes condicions de cultiu i subcultiu de les cèl·lules C6 de glioma de rata (ATCC) que proporcionaven patrons d'aparició de ML molt similars als obtinguts anteriorment en el grup amb les cèl·lules ECACC. Encara que el percentatge mínim de cèl·lules amb gotícules en la fase exponencial de la corba de creixement sigui més alt en aquest estudi (23 % vs. 2,0 %) això pot deure's en part a un canvi en el sistema de microscòpia, ja que la càmera DC200 permet treballar amb una grandària de píxel inferior que en treballs anteriors (Barba *et al.*, 1999) ( $0,11 \mu\text{m}/\text{píxel}$  vs.  $0,16 \mu\text{m}/\text{píxel}$ ). Finalment, els patrons espectrals obtinguts (veure secció 4.3) coincideixen qualitativament i quantitativament amb els anteriorment descrits (Barba *et al.*, 1999), i per tant el sistema experimental està llest per a realitzar estudis de marcatge amb  $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-glucosa}$  dels lípids neutres que originen els ML.



Els resultats de microscòpia òptica de cèl·lules tenyides amb *Nile Red* mostren un augment estadísticament significatiu en el volum total de lípids neutres tenyits amb aquesta sonda fluorescent en gotícules lipídiques citosòliques (taula 4.2) en les dues situacions estudiades envers la fase exponencial (dia 4). **El volum total de gotícules calculat en una cèl·lula C6 promig augmenta en un factor de 8,8 entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 de cultiu. En canvi, l'augment és de 27,3 vegades si comparem cèl·lules de dia 4 amb cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF.** La corba d'aparició de gotícules mostra però un comportament trimodal de l'aparició de gotícules al llarg de la corba de creixement, veient-se primer un augment en el percentatge de cèl·lules amb gotícules entre el dia de sembra i el dia 1 de cultiu, una disminució entre el dia 1 i el dia 4 de cultiu (mínim del percentatge,  $23 \% \pm 2,0 \%$ ), i un posterior augment fins a dia 7 de cultiu (màxim del percentatge,  $60 \% \pm 9,3 \%$ ). Les cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF presenten un 100 % de cèl·lules amb gotícules.

Tal i com es pot comprovar a la taula 4.3 i a la figura 4.5, els resultats de citometria de flux mostren clarament una significativa aturada de la proliferació de les cèl·lules C6 a dia 7 de cultiu (densitat de saturació) i a dia 7 de cultiu després de 48 hores d'incubació amb ACSF, comparades amb cèl·lules de dia 4 de cultiu. S'observa que el nombre de cèl·lules en fase S del cicle cel·lular és molt més baix en cèl·lules de dia 7 que en cèl·lules de dia 4 ( $6,0 \% \pm 0,6 \%$  vs.  $20,9 \% \pm 1,2 \%$ ). Aquests resultats són els esperables per cèl·lules crescudes en flascons de cultiu i, especialment per cèl·lules C6 de dia 4 i dia 7 de cultiu, concorda amb dades prèvies del grup (Barba *et al.*, 1999). El medi de cultiu ACSF no conté cap tipus de factors de creixement macromolecular, ja que no es va afegir sèrum, ni alguns compostos de baix pes molecular requerits pel creixement, com la colina, la qual si es troba present en el medi DMEM. L'efecte de 48 hores d'incubació amb ACSF (entre els dies 5 i 7 després de la sembra) és una aturada total de la proliferació cel·lular. El nombre de cèl·lules no augmenta

entre dia 5 i dia 7 de cultiu per les cèl·lules incubades amb ACSF, com s'observa a la figura 4.1. A més, la fase S disminueix en cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF ( $5,1 \% \pm 0,2 \%$ ) i respecte de cèl·lules de dia 7 cultivades en medi DMEM ( $6,0 \% \pm 0,6 \%$ ), tot i que aquesta disminució no és estadísticament significativa.

El tractament amb staurosporina de les cèl·lules C6 va induir l'aparició d'una regió subG0, la qual s'associa a la detecció de fragmentació de DNA coherent amb apoptosi, en un  $36,1 \% \pm 5,7 \%$  de cèl·lules. Per altra banda, aquest pic subG0 no va ser detectable en cèl·lules de dia 4, va ser molt poc intens en cèl·lules de dia 7 ( $1,8 \pm 0,3\%$ ) i lleugerament més intens en cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF ( $10,3 \pm 2,3\%$ ).

Els nostres resultats indiquen que l'aturada de la proliferació cel·lular indueix l'acumulació de gotícules lipídiques citosòliques en les cèl·lules C6, com ja s'havia descrit prèviament en el nostre grup (Barba *et al.*, 1999). Guilbaud i col·laboradors (Guilbaud *et al.*, 1990) també descrivien l'aparició de gotícules lipídiques citosòliques, detectades per microscòpia òptica, en cèl·lules en la línia cel·lular de càncer de mama humà MCF-7 quan s'aturava la seva proliferació amb els fàrmacs hexametilè bisacetamida (HMBA) i 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetat (TPA). Així mateix, les cèl·lules, 24 hores després de l'aturada de la proliferació, mostraven un augment en el volum cel·lular i una acumulació en la fase G0-G1 del cicle cel·lular, mesurat per citometria de flux, de manera anàloga als resultats obtinguts per les cèl·lules C6.

Així mateix, Delikatny i Jeitner (Delikatny & Jeitner, 1997) van estudiar l'efecte de bloquejants de cicle cel·lular (cisteamina, desferrioxamina i ADR 529) en la línia cel·lular de glioma humà 2607. Van comprovar que l'augment de la intensitat del senyal a 1,3 ppm en l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN correlacionava amb l'aturada del cicle cel·lular en G2/M. De tota manera, cèl·lules parcialment sincronitzades amb ADR 529 no mostraven un augment en el senyal a 1,3 ppm quan es trobaven en fase G2/M. Els autors conclouien que les variacions en la intensitat del senyal a 1,3 ppm

tenien a veure amb condicions d'estrés i no estaven correlacionades amb el moment del cicle cel·lular. Aquest mateix grup (Delikatny *et al.*, 1996a) va mostrar que no existia correlació entre l'increment de la intensitat dels senyals de lípids mòbils i el cicle cel·lular en cèl·lules L de fibroblasts murins transformats en condicions d'estrés de pH. En tots dos casos (Delikatny *et al.*, 1996a; Delikatny & Jeitner, 1997) els autors apunten a alteracions en el metabolisme de fosfolípids com la causa de la generació dels senyals de ML, ja que detectaven un augment de GPC quan augmentava la intensitat dels senyals de ML.

Finalment, els canvis de volum de la cèl·lula, que es poden relacionar amb apoptosi, estan associats també a l'etapa del cicle cel·lular. Així, els canvis en volum de la cèl·lula entre la fase exponencial i les cèl·lules confluents han estat descrits prèviament en cèl·lules C6 en condicions normals de cultiu (Valverde *et al.*, 2006). A més, Chen i col·laboradors (Chen *et al.*, 2002) van descriure un augment en volum cel·lular en les cèl·lules 3T3 que ocorria durant el procés de la diferenciació induït per troglitzone. En resum, la disminució del volum cel·lular promig en les cèl·lules C6 incubades amb ACSF respecte de les cèl·lules de dia 7 no sembla estar causat pel petit percentatge de cèl·lules apoptòtiques detectades, sino que apunta cap al fet que la privació dels factors del creixement en la incubació amb ACSF no permet que les cèl·lules C6 engrandeixin el seu volum, com seria el cas de l'efecte de la postconfluència per a les cèl·lules C6 en el dia 7 del cultiu de DMEM.

## 4.2 Cromatografia en capa prima

### 4.2.1 Optimització del mètode

Per poder emprar la cromatografia en capa prima com a mètode de quantificació en els extractes lipídics cel·lulars era necessari en primer lloc caracteritzar i optimitzar les condicions del mètode per ajustar-lo a les nostres necessitats. Tot i que aquesta

tècnica havia estat descrita i emprada prèviament per altres autors com a tècnica de separació i quantificació relativa, emprant *Coomassie Blue* per tenyir les capes fines (Nakamura & Handa, 1984; Sathasivam *et al.*, 2003), o emprant altres mètodes de tinció (Hirakawa *et al.*, 1991; Krämer *et al.*, 2002; Iorio *et al.*, 2003), no havia estat mai emprada la tècnica combinada TLC-tinció amb *Coomassie Blue*-densitometria com a tècnica quantitativa. Per això es van dur a terme diversos estudis previs per comprovar i millorar la reproductibilitat del protocol.

### 1. Optimització de la separació dels compostos

Es van realitzar capes primes per optimitzar la separació dels compostos a estudiar en els extractes cel·lulars. Es van emprar inicialment com a mostres barreges dels diferents compostos a separar en les mostres reals (colesterol, palmitat de colesteril, tripalmitin, dipalmitin i àcid palmític). Seguint la literatura (Findlay & Evans, 1987; Christie, 1973; Litchfield, 1972), es va comprovar que, dels diversos sistemes d'eluent possibles, el que permetia una millor separació en el nostre cas era n-hexà:dietilèter:àcid acètic (80:20:2). Es va comprovar la importància de preparar els eluent en el moment d'emprar-los, i de l'homogeneïtzació de la solució per agitació manual durant un minut abans de transvasar-la a la cubeta d'elució, ja que això assegurava la reproductibilitat dels Rf de les mostres. Es van emprar els Rf dels estàndards per assignar els compostos dels extractes. A la figura 4.6 es mostra una TLC de separació d'estàndards. Els valors de Rf dels estàndards dels compostos analitzats en els extractes es mostren a la taula 4.4

Aquests Rf es van emprar per assignar les taques de les TLCs dels extractes lipídics cel·lulars. Els Rf de les taques dels extractes lipídics es mostren a la taula 4.5. S'han inclòs també els Rf de les contaminacions més comunes que es van detectar en les TLCs. També es van fer capes primes d'extractes desti-

| <b>Compost</b>                    | <b>Rf</b> |
|-----------------------------------|-----------|
| 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol (DAG) | 0,052     |
| Colesterol                        | 0,087     |
| àcid palmític (AGL)               | 0,122     |
| tripalmitin (TAG)                 | 0,540     |
| palmitat de colesteril (EstCol)   | 0,857     |

Taula 4.4: Rfs dels estàndards lipídics en les TLCs obtingudes en hexà:dietilèter:àcid acètic

nats a la caracterització qualitativa inicial per comprovar l'eficàcia de separació del sistema cromatogràfic en mostres reals, i quin compostos s'hi trobaven presents. En els extractes es detecten els compostos colesterol, DAG, TAG i EstCol, que s'havien estudiat com estàndards, no es detectaren àcids grassos lliures, i es va detectar una taca no assignada de Rf= 0,696, que va ser posteriorment analitzada (veure 4.2.3). Les proves amb extractes cel·lulars no destinats a la quantificació també van mostrar que, tot i que s'obtenia una bona separació, es detectava en aquestes mostres la presència de diverses possibles contaminacions. Es va determinar que aquestes contaminacions provenien del material de plàstic emprat inicialment en el procés d'extracció, i no dels eluents ni dels compostos de tinció (figura 4.7).

| <b>Rf</b> | <b>Assignació</b>     |
|-----------|-----------------------|
| 0,052     | DAG                   |
| 0,087     | Colesterol            |
| 0,122     | AGL                   |
| 0,540     | TAG                   |
| 0,696     | compost desconegut    |
| 0,857     | EstCol                |
| 0,920     | contaminació plàstics |

Taula 4.5: Assignació de les taques de les TLCs inicials d'extractes lipídics cel·lulars obtingudes en hexà:dietilèter:àcid acètic

Aquestes contaminacions provocaven molts problemes a l'hora d'analitzar les TLCs quantitatives (figures 4.8 i 4.9). Probablement, els dissolvents orgànics emprats en l'extracció dissolen algun component de tipus lipídic (greixos?)

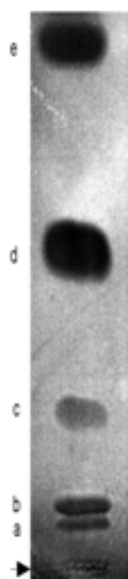


Figura 4.6: TLC de separació dels estàndards que es pretenen identificar posteriorment en un extracte de cèl·lules C6. a-1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol(DAG), b-colesterol, c-àcid palmític (AGL), d-tripalmitin(TAG), e-palmitat de colesteril (Est-Col). La fletxa indica el punt d'aplicació de la mostra.

que es troba en les superfícies dels plàstics comercials, i aquests components acaben apareixent en la nostra capa prima. Per tant, es va decidir no emprar cap material de plàstic durant el procés d'extracció (puntes de pipeta, recipients, etc). L'altra tipus de contaminació observat era degut a residus en la xeringa hamilton. Aquesta contaminació es va eliminar netejant exhaustivament la xeringa abans i després de cada ús.

## 2. Minimització de la variabilitat del mètode

Es van realitzar capes primes per optimitzar les condicions d'aplicació i comprovar la variabilitat intrínseca del mètode. Per una banda, es van realitzar capes primes aplicant tripalmitin a una determinada concentració en 10 replicats. Es van provar diferents concentracions per abastar el rang més ampli possible, i també diferents volums d'aplicació. Les concentracions emprades van ser: 3,8mg/ml ( $5\mu\text{l}$  i  $25\mu\text{l}$ ), 2mg/ml ( $5\mu\text{l}$ ) i 0,4mg/ml ( $5\mu\text{l}$ ). Com es pot

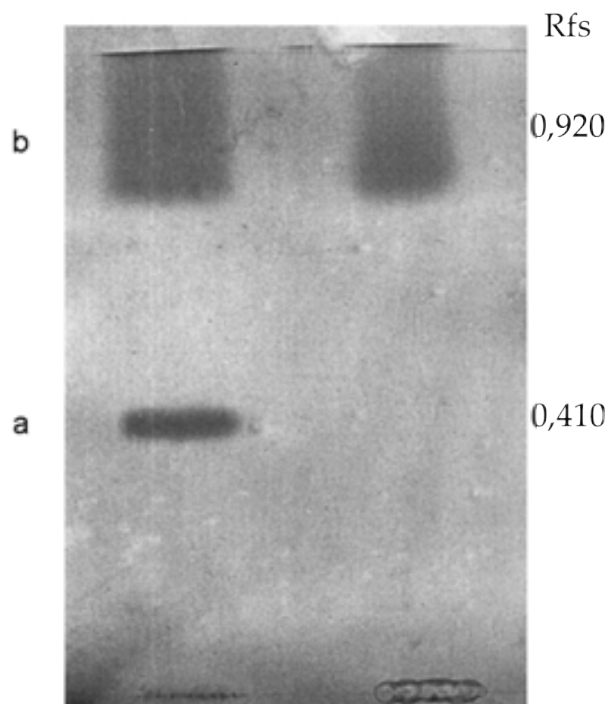


Figura 4.7: TLC on es mostren els dos tipus de contaminació més freqüents en les capes primes. a- Contaminació per residus en la xeringa hamilton; b- contaminació deguda a residus adherits a les superfícies plàstiques. A la dreta es mostren els Rfs de les taques.

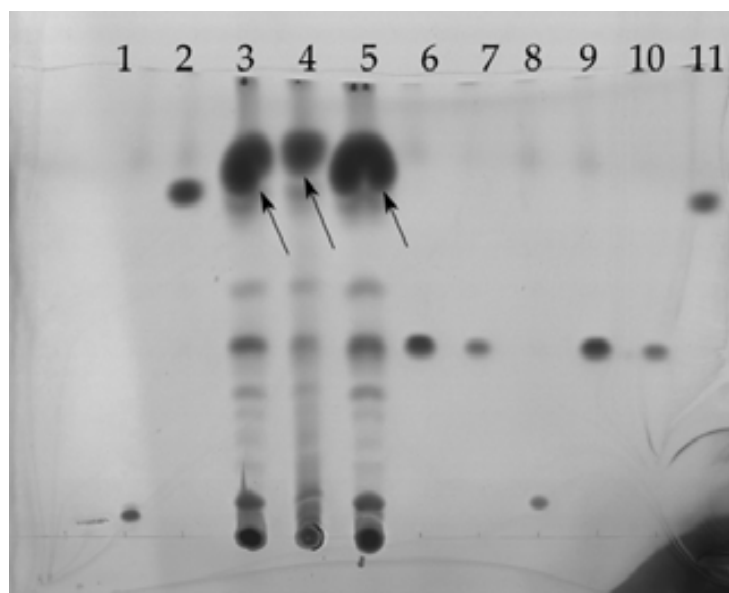


Figura 4.8: TLC on es mostra la contaminació en una capa prima d'extractes lipídics. 1- DAG 10 µg; 2- EstCol 10 µg; 3, 4 i 5- 25 µl d'extracte obtingut de 200 × 10<sup>6</sup> cèl·lules de dia 7 de cultiu; 6 i 9- TAG 10 µg; 7 i 10- TAG 2 µg; 8- DAG 2 µg; 11- EstCol 2 µg. Les fletxes assenyalen la taca de contaminació

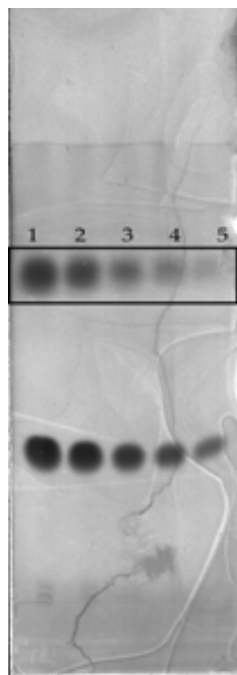


Figura 4.9: TLC on es mostra la contaminació en una capa prima de tripalmitin. 1- 10  $\mu\text{g}$ ; 2- 7,5  $\mu\text{g}$ ; 3- 5  $\mu\text{g}$ , 4- 2,5  $\mu\text{g}$  i 5- 1,25  $\mu\text{g}$ . En el requadre es mostra la taca de contaminació deguda als plàstics.

observar a la taula 4.6, la menor variació es va aconseguir amb la combinació 3,8mg/ml, 5 $\mu\text{l}$  i la combinació 0,4mg/ml (5 $\mu\text{l}$ ). Això ens va suggerir que l'aplicació havia de ser de 5 $\mu\text{l}$ , i el ventall de concentracions entre 0,4 i 4mg/ml.

Posteriorment, es va aconseguir reduir la variabilitat en els resultats deguda a l'aplicació de les mostres. Per poder tenir concentracions dels compostos continguts en els extractes que es trobessin dins del rang de quantificació dels estàndards, es va comprovar que era necessari aplicar un mínim de 25 $\mu\text{l}$  de mostra. L'aplicació d'aquest volum provocava una difusió de la taca d'aplicació, i per tant els compostos no corrien homogèniament al llarg de la capa prima. Les variacions obtingudes inicialment per una taca de TAG en 10 replicats d'un extracte van arribar a ser del 48%. Es va optar per dipositar la mostra en forma de línia sobre una zona prèviament assenyalada de la TLC. D'aquesta manera es minimitzava la difusió. També es van posar a prova els



diferents aparells i programes a l'abast per analitzar densitomètricament les capes primes. Els diferents mètodes testats van ser:

- **Escàner GS-700 i programa *MultiAnalyst Versió 1.1 Build 34* (BioRad) al LAFEAL:** aquest va ser el sistema inicialment utilitzat. Es va consultar els tècnics de BioRad i del LAFEAL, els quals en van desaconsellar el seu ús, ja que la reproductibilitat no era suficient, degut a la poca sensibilitat de l'aparell. Es va descartar.
- **Escàner Umax ASTRA 4000U i programa *ImageMaster 2D platinum V5.0* (BioRad) al Servei de Proteòmica i Bioinformàtica (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB):** el sistema està optimitzat per l'anàlisi de gels bidimensionals de proteïnes, la qual cosa obliga a seleccionar una forma geomètrica per la banda a analitzar. Donat que la forma de les bandes obtingudes en les capes primes no corresponia a cap de les possibilitats del sistema, els resultats produïen un alt grau d'error. Es va descartar.
- **Fluorímetre FluorS i programa *QuantityOne* (BioRad) al LAFEAL:** la possibilitat d'obtenir una fotografia densitomètrica ens proporciona molta més sensibilitat, era possible ajustar l'amplada de la banda i del carril, tal com es veu a la figura 4.10. El fet d'obtenir una fotografia densitomètrica permetia millorar la sensibilitat respecte dels altres mètodes. S'obtenia un perfil densitomètric i el promig de la intensitat de la banda a analitzar, permetent uns resultats acurats. Aquest va ser el mètode finalment escollit.

La combinació de l'aplicació lineal i l'ús del sistema Fluorímetre FluorS i programa *QuantityOne* (BioRad) (LAFEAL) van permetre minimitzar la variabilitat, fins a obtenir un coeficient de variació màxim del 10%.

| concentració<br>(mg/ml) | volum aplicat | coeficient<br>de variabili-<br>tat (desv.est/promig) |
|-------------------------|---------------|--|
| 10                      | 25            | 9,3%   |
| 3,8                     | 25            | 21,2%  |
| 3,8                     | 5             | 8%   |
| 2                       | 5             | 10%  |
| 0,4                     | 25            | 11,6%  |
| 0,4                     | 5             | 9%   |

Taula 4.6: Variabilitat del mètode de TLC segons la concentració i volum de mostra aplicats. n= 10 en cada cas.

Per comprovar la linealitat del mètode, es van obtenir rectes de calibratge per cadascun dels lípids neutres a quantificar en els extractes. Tal i com es veu a la figura 4.11, les rectes de calibratge per triplamitin, dipalmitin i palmitat de colesteril, en el rang d'estudi de les mostres, presenten una correlació lineal entre concentració i densitat òptica ( $r^2=0,95$ ). D'aquesta manera es va validar el mètode com a quantitatiu pel ventall de concentracions i mostres estudiades. També es va comprovar que el procés de tinció de les capes primes podia generar una variabilitat en els resultats de densitat òptica, de manera que es va optar per obtenir una recta de calibratge interna en cada capa prima de quantificació.

#### 4.2.2 Quantificació dels lípids neutres presents en extractes lipídics de cèl·lules C6

Es van analitzar quantitativament les capes primes obtingudes de tots els extractes cel·lulars. Es van analitzar tres tipus de mostres: cèl·lules de dia 4, cèl·lules de dia 7 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF. Es van obtenir 9 cromatografies de capa prima, per cada tipus de mostra i per cada compost a quantificar. La quantificació es va fer emprant la recta de calibratge interna obtinguda a la mateixa capa prima. La densitat òptica de la taca del compost a quantificar en l'extracte era convertida a

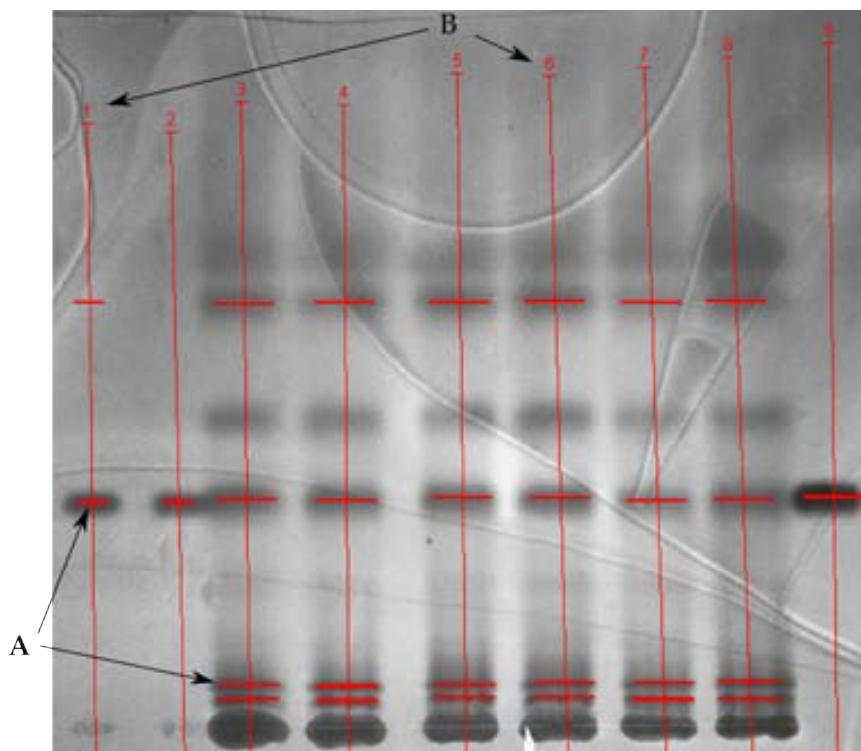


Figura 4.10: Imatge de la selecció de bandes en les TLCs emprant el programa QuantityOne i el fluorímetre Fluor-S de BioRad. Com es pot comprovar, es pot A-ajustar l'amplada de la banda B-ajustar el carril i la posició de la banda

unitats de massa mitjançant la recta de calibratge. Es van referenciar els valors en  $\mu$ grams al nombre de cèl·lules, al pes del sediment cel·lular, al volum cel·lular, al volum citoplasmàtic, i al contingut de proteïna. Les dades obtingudes es mostren a la taula 4.7. En les seccions 3.2, 3.3 i 3.6 es descriu la mesura de cadascuna de les referències.

Pel què fa a la quantificació de TAG, si comparem les dades de cèl·lules de dia 4 i de dia 7, tot i que s'observa un augment significatiu del contingut de TAG en  $\mu$ grams/g cèl·lula, i una disminució significativa si s'expressa com  $\mu$ grams/pl citoplasma, i  $\mu$ grams/pl cèl·lula, no hi ha diferències significatives en les dades expressades com  $\mu$ grams /  $10^8$  cèl·lules i  $\mu$ grams/mg proteïna. Per les cèl·lules incubades amb ACSF, si les comparem amb les cèl·lules de dia 4, no s'observen diferències significatives en cap dels valors obtinguts, i si es comparen amb les cèl·lules de dia 7, s'observa una disminució significativa en el contingut de TAG expressat en

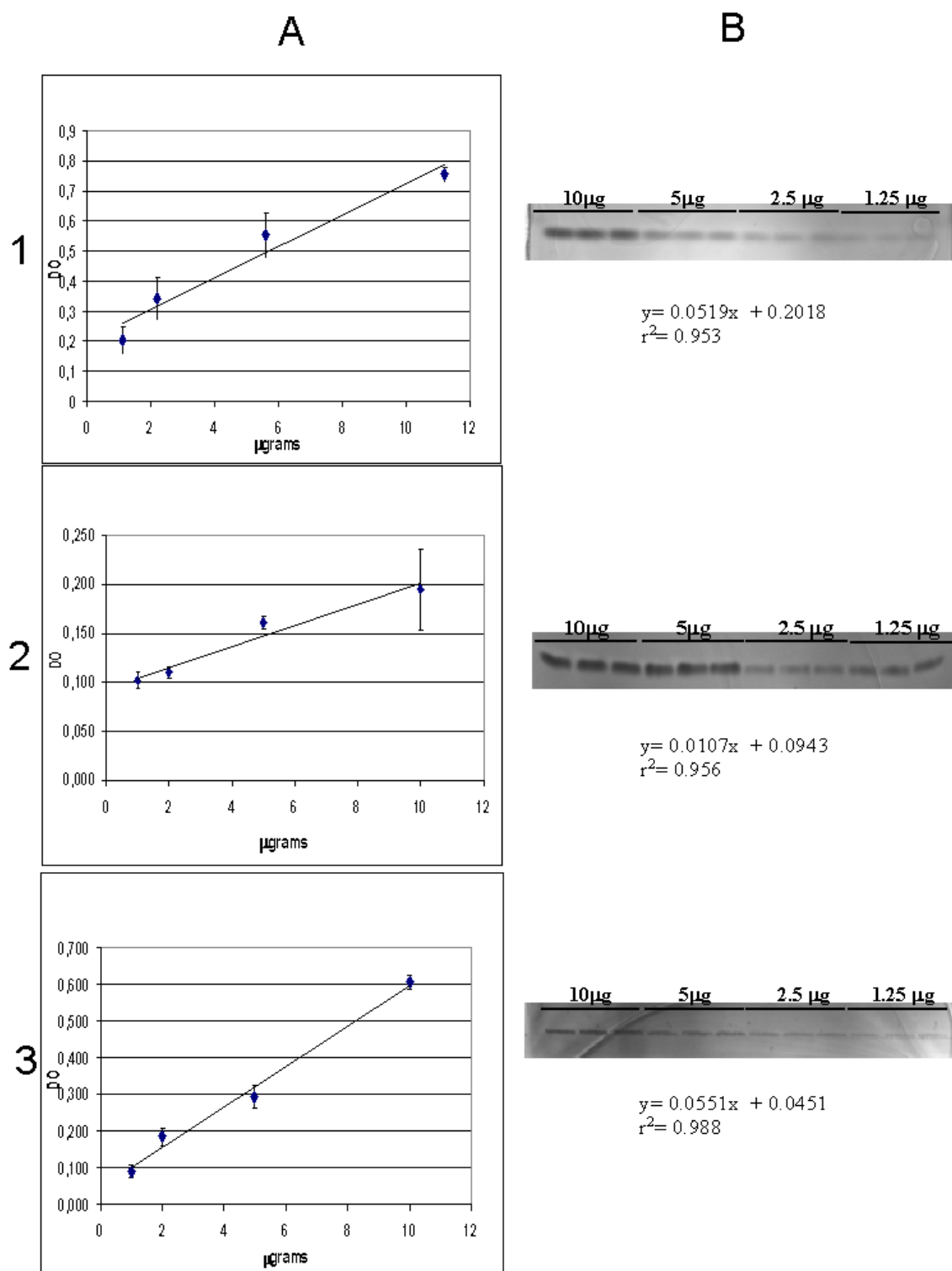


Figura 4.11: Rectes de calibratge dels estàndards a quantificar en els extractes. A- representació gràfica de les rectes; les barres indiquen  $\pm SD$ . B- fragment de la TLC de les rectes, on s'indica la quantitat d'estàndard aplicat, l'equació ajustada per regressió lineal i el coeficient de correlació  $r^2$  per la regressió. 1- tripalmitin, 2- diacilglicerol, 3- palmitat de colesteril.

| <b>A-TAG</b>   | <b>Cèl·lules de dia 4<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules de dia 7<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules incuba-<br/>des amb ACSF<br/>(n=3)</b> |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|---|
| $\mu\text{g}/10^8$ cèl·lules.  | 86,30 $\pm$ 23,38                   | 110,18 $\pm$ 39,37                  | 73,61 $\pm$ 37,34                                   |
| $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteïna                                     | 4,48 $\pm$ 0,91                     | 7,37 $\pm$ 2,18                     | 4,91 $\pm$ 2,33                                     |
| $\mu\text{g}/\text{g}$ cèl·lules * $\&$                              | 149,33 $\pm$ 62,30                  | 291,42 $\pm$ 113,26                 | 161,01 $\pm$ 75,56                                  |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ citoplasma * $\&$                            | 61,65 $\pm$ 18,90                   | 21,77 $\pm$ 7,33                    | 44,08 $\pm$ 20,96                                   |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ cèl·lules * $\&$                             | 43,15 $\pm$ 13,23                   | 19,33 $\pm$ 6,51                    | 33,46 $\pm$ 15,91                                   |
| <b>B-DAG</b>   | <b>Cèl·lules de dia 4<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules de dia 7<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules incuba-<br/>des amb ACSF<br/>(n=3)</b> |
| $\mu\text{g}/10^8$ cèl·lules * $\&$                                  | 63,98 $\pm$                         | 11,85 30,85 $\pm$                   | 6,77 66,67 $\pm$ 20,12                              |
| $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteïna * $\&$                              | 3,79 $\pm$ 0,64                     | 2,06 $\pm$ 0,45                     | 4,44 $\pm$ 1,47                                     |
| $\mu\text{g}/\text{g}$ cèl·lules * $\&$ $\&$                         | 106,79 $\pm$ 17,04                  | 79,81 $\pm$ 16,79                   | 145,83 $\pm$ 48,17                                  |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ citoplasma * $\&$                            | 45,70 $\pm$ 8,67                    | 6,10 $\pm$ 1,32                     | 39,92 $\pm$ 13,19                                   |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ cèl·lules * $\&$                             | 31,99 $\pm$ 6,07                    | 5,41 $\pm$ 1,18                     | 30,30 $\pm$ 10,01                                   |
| <b>C-EstCol</b>  | <b>Cèl·lules de dia 4<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules de dia 7<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules incuba-<br/>des amb ACSF<br/>(n=3)</b> |
| $\mu\text{g}/10^8$ cèl·lules   | 43,02 $\pm$ 7,03                    | 44,41 $\pm$ 1,09                    | 32,87 $\pm$ 11,82                                   |
| $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteïna                                     | 2,26 $\pm$ 0,47                     | 2,96 $\pm$ 0,09                     | 2,19 $\pm$ 0,88                                     |
| $\mu\text{g}/\text{g}$ cèl·lules * $\&$                              | 72,32 $\pm$ 15,64                   | 115,28 $\pm$ 7,32                   | 71,90 $\pm$ 28,94                                   |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ citoplasma * $\&$ $\&$                       | 30,73 $\pm$ 6,43                    | 8,78 $\pm$ 0,28                     | 19,68 $\pm$ 7,92                                    |
| $\mu\text{g}/\text{pl}$ cèl·lules *                                  | 21,51 $\pm$ 4,50                    | 7,79 $\pm$ 0,25                     | 14,94 $\pm$ 6,01                                    |
| <b>D-contingut glo-<br/>bal d'àcids grassos<br/>(TAG+DAG+EstCol)</b> | <b>Cèl·lules de dia 4<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules de dia 7<br/>(n=3)</b> | <b>Cèl·lules incuba-<br/>des amb ACSF<br/>(n=3)</b> |
| $\mu\text{mol}/10^8$ cèl·lules                                       | 0,615 $\pm$ 0,097                   | 0,589 $\pm$ 0,151                   | 0,561 $\pm$ 0,157                                   |
| $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteïna                                   | 0,034 $\pm$ 0,005                   | 0,037 $\pm$ 0,009                   | 0,037 $\pm$ 0,010                                   |
| $\mu\text{mol}/\text{g}$ cèl·lules                                   | 1,047 $\pm$ 0,241                   | 1,549 $\pm$ 0,425                   | 1,227 $\pm$ 0,335                                   |
| $\mu\text{mol}/\text{pl}$ citoplasma<br>* $\&$                       | 0,439 $\pm$ 0,077                   | 0,116 $\pm$ 0,028                   | 0,336 $\pm$ 0,092                                   |
| $\mu\text{mol}/\text{pl}$ cèl·lules * $\&$ $\&$                      | 0,308 $\pm$ 0,054                   | 0,103 $\pm$ 0,025                   | 0,255 $\pm$ 0,070                                   |

Taula 4.7: Quantificació per TLC dels lípids neutres en extractes de cèl·lules C6.\* Diferències estadísticament significatives entre dia 4 i dia 7  $\&$  Diferències estadísticament significatives entre dia 7 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF  $\&$  Diferències estadísticament significatives entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF

$\mu\text{grams/pl}$  citoplasma i  $\mu\text{grams/pl}$  cèl·lula, i un increment significatiu, si s'expressa en  $\mu\text{grams/g}$  cèl·lula.

El contingut en DAG presenta diferències significatives entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 en tots els casos. Hi ha una disminució en el contingut de DAG de dia 4 a dia 7, indicant que no hi ha un augment en el contingut de DAG al llarg de la corba de creixement, ans si de cas una disminució. Si comparem el contingut en DAG entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules incubades amb ACSF només s'observa un augment significatiu si el contingut s'expressa com  $\mu\text{grams/g}$  cèl·lula. En comparar els resultats per cèl·lules incubades amb ACSF i cèl·lules de dia 7, hi ha diferències significatives en tots els casos, i els valors per les cèl·lules ACSF són més alts que els valors per les cèl·lules de dia 7.

Finalment, l'anàlisi estadística dels resultats del contingut d'EstCol mostra que, en comparar cèl·lules de dia 4 amb cèl·lules de dia 7, hi ha un augment significatiu quan el contingut s'expressa en  $\mu\text{grams/g}$  cèl·lula, i una disminució significativa quan s'expressa com  $\mu\text{grams/pl}$  citoplasma i  $\mu\text{grams/pl}$  cèl·lula. No s'observen diferències quan s'expressa com  $\mu\text{grams}/10^8$  cèl·lules i  $\mu\text{grams/mg}$  proteïna. En comparar els valors per cèl·lules de dia 4 i cèl·lules incubades amb ACSF, només es troba una disminució significativa quan el contingut s'expressa com  $\mu\text{grams/pl}$  citoplasma. La comparació entre cèl·lules incubades amb ACSF i cèl·lules de dia 7 indica que hi ha un augment si el contingut s'expressa com  $\mu\text{grams/g}$  cèl·lules.

Així mateix, es va calcular la concentració en  $\mu\text{mols}$  d'àcids grassos en cadascuna de les mostres, a partir dels valors de  $\mu\text{grams}$  de lípids neutres. Per fer la conversió d'unitats, es va considerar el pes molecular dels estàndards emprats per cadascun dels lípids neutres: per triacilglicerols, pes molecular de tripalmitin, 807 g/mol; per diacilglicerols, pes molecular de dipalmitin, 568 g/mol; per ésters de colesterol, pes molecular de palmitat de colesteril, 625 g/mol. Per cada tipus de mostra, es van sumar els  $\mu\text{mols}$  d'àcids grassos provinents de cada tipus de lípid

neutre, per obtenir-ne el contingut total. Els resultats es mostren a la taula 4.7. Com es pot observar, no hi ha diferències significatives en el contingut en àcids grassos obtingut per les tres situacions estudiades i expressat respecte de qualsevol referència, excepte les referides a volum cel·lular o citoplasmàtic. Per tant, **el contingut en àcids grassos en forma de lípids neutres a les cèl·lules no canvia al llarg de la corba de creixement.**

### 4.2.3 Caracterització de la taca no identificada amb $R_f = 0,696$

Es va observar a les capes primes d'extractes la presència d'una taca a  $R_f = 0,696$ , sense assignar. A la bibliografia es descriu la presència de mono- i digalactosil glicèrids en cervell (Slagel *et al.*, 1967) i es va considerar la possibilitat que es tractés d'aquest compost. Es va realitzar una capa prima en les nostres condicions de separació aplicant tripalmitin (2,2 mg/ml i 0,44 mg/ml, 5 $\mu$ l) i monogalactosil diglicèrid (MGDAG) (Sigma, Espanya)(2 mg/ml, i 0,4mg/ml 5 $\mu$ l) com a mostres. Es va comprovar que els dos compostos tenien un  $R_f = 0,54$  ( figura 4.12). Per tant, la taca sense assignar no corresponia a monogalactosil diglicèrid, i podia haver contribuït als nostres resultats de quantificació de triacilglicerols. Per descartar o confirmar aquesta possibilitat, es va posar a punt un sistema cromatogràfic que permetés la separació de tripalmitin i MGDAG, basant-nos en la bibliografia (Christie, 1973; Litchfield, 1972; Findlay & Evans, 1987). Els eluents emprats van ser acetona: àcid acètic :aigua (100:2:1 en volum). Es va córrer una capa prima emprant com a mostres tripalmitin i MGDAG, i es va comprovar que els compostos es separaven entre si, amb  $R_f = 0,711$  pel MGDAG i  $R_f = 0,830$  pel TAG.

Finalment, es va córrer una capa prima en acetona: àcid acètic :aigua (100:2:1 en volum), aplicant MGDAG (2 mg/ml i 0,4 mg/ml, 5 $\mu$ l), i dos extractes de cèl·lules, de dia 4 i de dia 7 (25 $\mu$ l). No es va detectar la presència de MGDAG en els extractes ( figura 4.13). Per descartar completament que aquest compost hagués pogut inter-

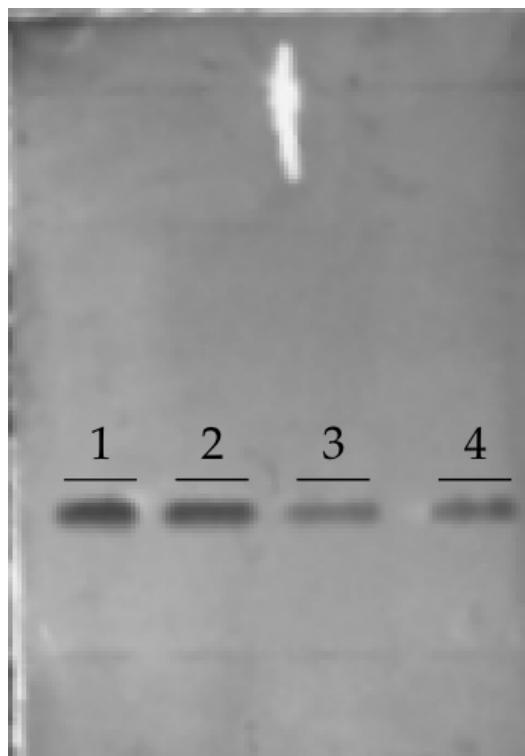


Figura 4.12: TLC de tripalmitin i monogalactosil diacilglicerol en hexà:dietilèter:àcid acètic (80:20:2). 1-Tripalmitin 11 $\mu$ g, 2-MGDAG 10 $\mu$ g; 3-tripalmitin 2,2 $\mu$ g; 4-MGDAG 2 $\mu$ g

ferir en les quantificacions de TAG, es va obtenir una recta de calibratge en el rang més baix de concentracions en què el MGDAG era detectable (entre 0,05 i 0,005 $\mu$ g)(figura 4.14 i es va calcular el percentatge del senyal dels TAG dels extractes que podria ser degut a MGDAG. Tot i que no s'observa per densitometria la presència de MGDAG en els extractes, el percentatge màxim de lípids quantificats com TAG que podrien ser MGDAG i no ser detectats en el sistema cromatogràfic acetona:àcid acètic :aigua (100:2:1 en volum) és d'1,6% per extractes de cèl·lules de dia 4 i de 0,47% per cèl·lules de dia 7. Per tant, es va considerar que aquesta interferència, si es presentés, no afectaria significativament els nostres resultats.

Aquesta taca no assignada va ser estudiada també per RMN. La taca es va rascar de la capa prima després de la tinció, i la pols de sílica es va sotmetre a un procés d'extracció amb metanol durant 10 min en un bany sonicador. El líquid obtingut es va processar per 1D-<sup>1</sup>H-RMN. Els espectres obtinguts mostren només el senyal del



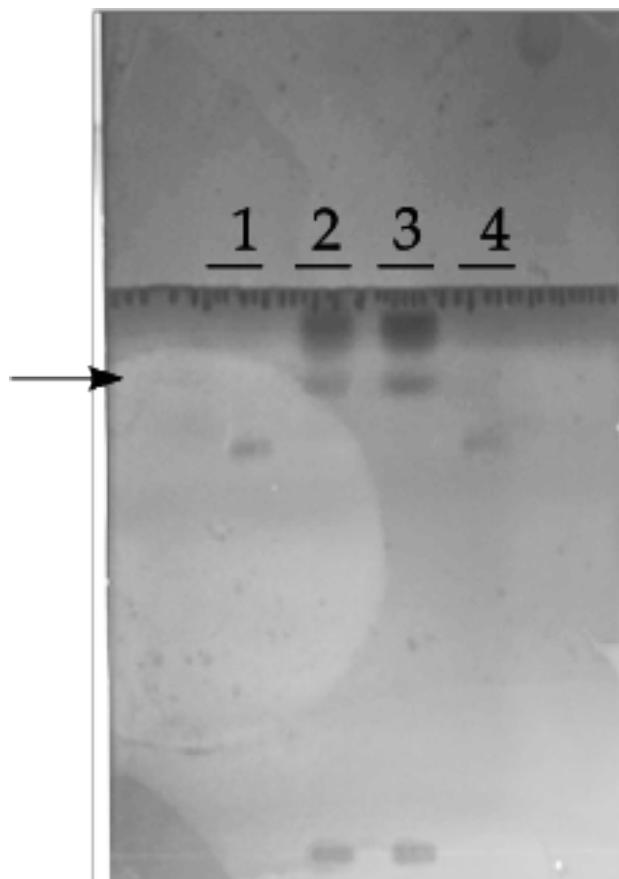


Figura 4.13: TLC per la identificació del compost monogalactosildiàcilglicerol en extractes lipídics de cèl·lules 1-MGDAG  $10\ \mu\text{g}$  ; 2-extracte de cèl·lules de dia 7 de cultiu; 3-extracte de cèl·lules de dia 4 de cultiu; 4-MGDAG  $5\ \mu\text{g}$  ( $R_f = 0,711$ ). La fletxa assenyalava els TAG en els extractes ( $R_f = 0,830$ ).

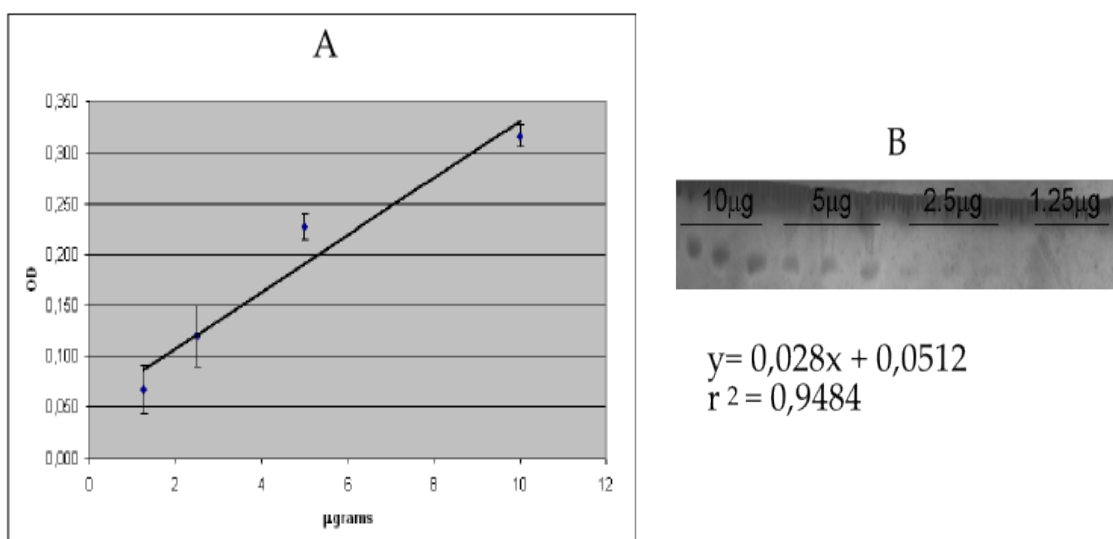


Figura 4.14: Recta de calibratge del compost monogalactosildiàcilglicerol. A- representació de la recta B- TLC de la recta i equació



Figura 4.15: TLC d'extractes per identificar la presència d'éter de DAG. Mostres: éter de DAG 1,2- 5  $\mu$ l concentració 10mg/ml, 9-10 5  $\mu$ l concentració 2mg/ml; 3-5 extractes de cèl·lules de dia 4 de cultiu, 25  $\mu$ l; 6-8 extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu, 25  $\mu$ l.

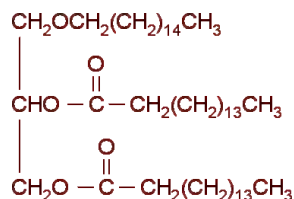


Figura 4.16: Estructura química de l'éter de DAG 1-O-palmitil-2,3-dipalmitoil-rac-glicerol

*Coomassie Blue* emprat per tenyir la capa prima.

Finalment, es va trobar a la bibliografia que aquesta taca podia correspondre a alquiléters de diacilglicerol (Hirakawa *et al.*, 1991; Ferretti *et al.*, 1999). En aquest cas, es van córrer diverses capes primes amb tots els estàndards de lípids neutres, i també un estàndard d'éter de diacilglicerol, concretament 1-O-palmitil-2,3-dipalmitoil-rac-glicerol. Finalment es va córrer una capa prima d'extractes de cèl·lules C6 i l'estàndard (figura 4.15 i 4.16). Es va poder comprovar que l'Rf d'aquest alquiléter corresponia amb el de la taca sense identificar en els extractes és a dir Rf= 0,696, com es mostra a la figura 4.15.

En aquest capa prima es va emprar per la tinció una solució amb una concentració més baixa de *Coomassie Blue* ( 0,03 % pes/volum en metanol 20% v/v), per optimitzar el procés de tinció/destinció. Tot i que no es va poder quantificar de manera absoluta el contingut del compost d'Rf= 0,696, es va fer una quantificació relativa, referenciant la densitat òptica de la taca del compost al nombre de cèl·lules en l'extracte (taula 4.8). L'anàlisi estadística de les dades mostra que la densitat òptica disminueix entre les tres situacions estudiades, tot i que només ho fa de manera significativa entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 incubades amb ACSF, indicant que hi

| condició de cultiu | DO/ $\mu$ grams de cèl·lules (n=3) |
|--------------------|------------------------------------|
| dia 4              | 0,16 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>       |
| dia 7              | 0,13 $\pm$ 0,01                    |
| dia 7 ACSF         | 0,08 $\pm$ 0,03                    |

Taula 4.8: Densitat òptica de la taca d'Rf= 0,696 en les diferents situacions estudiades  
<sup>a</sup> diferències significatives entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 incubades amb ACSF

hauria una disminució del contingut d'aquest compost.

#### 4.2.4 Discussió dels resultats dels experiments de TLC

Els experiments de TLC van mostrar que aquesta tècnica és òptima per la separació de lípids, però que per poder emprar-la com a tècnica quantitativa és necessari eliminar qualsevol tipus de possible contaminació, i optimitzar el sistema d'aplicació de les mostres i de tinció de les capes primes. La TLC ens ha permès quantificar els lípids neutres dels extractes de cèl·lules C6. Pel què fa a les contaminacions, s'ha descrit en la bibliografia la interacció entre el material plàstic del tubs i els lípids que contenen aquests tubs (Lee, 1971). Tot i que s'hi descriu la pèrdua de mostra per unió al plàstic, que és recuperada per extracció amb cloroform/metanol, és possible que aquesta barreja de dissolvents pugui dissoldre també altres lípids que es trobin en la superfície plàstica.

Un element important a destacar és el tipus de referència que cal emprar per la quantificació del lípids neutres. En el nostre cas hem emprat cinc referències: nombre de cèl·lules, pes de cèl·lules, pes de proteïna, volum citosòlic i volum cel·lular. Cadascuna d'aquestes referències serà vàlida en un determinat context, però cap d'elles és vàlida per totes les comparacions. Depenent de les dades que vulguem comparar, caldrà emprar les dades de contingut de lípid neutre respecte d'una referència determinada que ens proporcioni el tipus d'informació que es requereix. El problema de la referència és força comú (Valverde *et al.*, 2006) i cal tenir-lo present per poder extraure conclusions correctes de les dades experimentals.

Pel què fa als resultats de quantificació de lípids neutres per TLC, podem comparar per cada lípid neutre els resultats obtinguts per cada situació cel·lular (taula 4.7). Tant per TAG com per DAG i per EstCol, s'observa que el contingut és molt similar en cèl·lules de dia 4 i de dia 7 incubades amb ACSF per totes les referències de quantificació emprades. Si comparem per qualsevol lípid neutre les dades referenciades a volum cel·lular o citoplasmàtic entre les tres situacions estudiades, s'observa que el valor per cèl·lules de dia 7 sempre és més baix. Cal recordar que les cèl·lules de dia 4 de cultiu i de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF tenen un volum cel·lular molt similar, mentre que les cèl·lules de dia 7 tenen un volum cel·lular més gran (taula 4.2). Les diferències observades en les dades referenciades a pl cèl·lula i pl citosol són estadísticament significatives.

En el cas de TAG i EstCol, observem que els valors per  $\mu\text{grams} / \text{g}$  cèl·lula, com  $\mu\text{grams} / 10^8$  cèl·lules i  $\mu\text{grams} / \text{mg}$  proteïna són més alts per les cèl·lules de dia 7 que per les cèl·lules de dia 4 i dia 7 incubades amb ACSF, i s'observen diferències estadísticament significatives en les dades expressades com  $\mu\text{grams} / \text{g}$  cèl·lula. En canvi, per la quantificació de DAG, totes les dades presenten diferències significatives, i les quantificacions mostren que el contingut en DAG és menor en les cèl·lules de dia 7 de cultiu que en les de dia 4 de cultiu i dia 7 de cultiu incubades amb ACSF. Així mateix, el contingut en àcids grassos en forma de lípids neutres a les cèl·lules C6 no canvia al llarg de la corba de creixement.

A la taula 4.9 es troben recollides diverses quantificacions de lípids neutres descrites a la bibliografia. Si comparem les dades referenciades a  $10^8$  cèl·lules amb dades de la literatura per altres tipus cel·lulars, trobem que Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) mesuren un contingut d'1,1 nmol TAG/ $10^6$  cèl·lules en el cas de fibroblasts 3T3 en fase exponencial de la corba de creixement. Aquesta dada es pot convertir a  $\mu\text{grams} / 10^8$  cèl·lules, emprant un pes molecular promig de 807 g/mol pels TAG (pes molecular del tripalmitin, l'estàndard de TAG que s'ha emprat en

aquesta tesi), obtenint un valor de 88,8  $\mu\text{grams TAG}/10^8$  cèl·lules 3T3 , un valor molt similar al que es recull a la taula 4.7 per les cèl·lules C6 en fase exponencial dia 4 de cultiu, 86,3  $\mu\text{grams}/10^8$  cèl·lules. En aquest mateix treball, els autors descrivien que els fibroblasts 3T3, després d'una transformació amb l'oncogen *ras* no presentaven cap canvi en els contingut de TAG, tot i que el senyal de lípids mòbils visibles per RMN disminuïa en un factor de 2. Per altra banda, Mackinnon i col·laboradors (Mackinnon *et al.*, 1992) van trobar valors per cèl·lules CHO d'ovari de hamster xinès una mica més alts, al voltant de 190  $\mu\text{grams TAG}/10^8$  cèl·lules CHO. Hakumäki i col·laboradors (Hakumaki *et al.*, 1999) van analitzar per cromatografia gas-líquid extractes lipídics de tumors BT4C en rates tractats amb ganciclovir, no tractats i cervell normal. Observen que el contingut en TAG és més alt en tumors no tractats o 4 dies després del tractament que en cervell normal i tumors 8 dies després del tractament (taula 4.9). Els valors obtinguts per aquests autors per tumors no tractats estarien d'acord en les dades obtingudes per C6 mostrades en aquesta tesi, considerant una equivalència aproximada de  $10^8$  cèl·lules tumorals/ g pes fresc *in vivo* (Moreno *et al.*, 1993), excepte pel que fa a la concentració d'àcids grassos lliures, que en el nostre cas no són detectables.

Rosi i col·laboradors (Rosi *et al.*, 1999) descriuen una disminució en els senyals de TAG en espectres de RMN de  $^1\text{H}$  d'extractes de cèl·lules HeLa al llarg de la corba de creixement. Els autors prenen aquesta disminució com un indicatiu de disminució en el contingut de TAG en les cèl·lules HeLa intactes al llarg de la seva corba de creixement, però no donen dades quantitatives. La corba de creixement de les cèl·lules HeLa que es presenta en el seu treball mostra que les cèl·lules estudiades no eren en punts temporals fàcilment comparables als estudiats en aquesta tesi . Així, es pot veure a la figura reproduïda del seu treball ( figura 4.17) que el nombre de cèl·lules es trobava encara augmentant de manera exponencial en el darrer punt temporal considerat. Per tant, Rosi i col·laboradors podrien estar estudiant moments sem-

blants als dies 0-1 i 4-5 de la nostra corba de creixement (veure figures 4.1 i 4.2). Les seves dades per cèl·lules HeLa a temps curt de ressembla podrien correspondre amb les nostres dades de dia 1 de ressembla per cèl·lules C6. La ressembla a partir de cèl·lules de dia 6 ( fase exponencial) proporciona cultius amb una alta intensitat en els senyals de ML. Aquestes dades estarien d'acord amb l'augment en el nombre de cèl·lules positives detectades en les cèl·lules C6 després de la ressembla. Els cultius mantinguts fins a dia 6 mostren una disminució en la intensitat del senyals de ML que es podria correspondre amb la disminució en el percentatge de cèl·lules positives que nosaltres detectem en les cèl·lules C6. En definitiva, sembla probable que el diferent temps de duplicació de les cèl·lules HeLa i C6 faci impossible la comparació de resultats dia a dia, però la comparació per fases de la corba de creixement mostra que les dues línies cel·lulars es podrien comportar de manera molt similar pel que fa al contingut de ML.

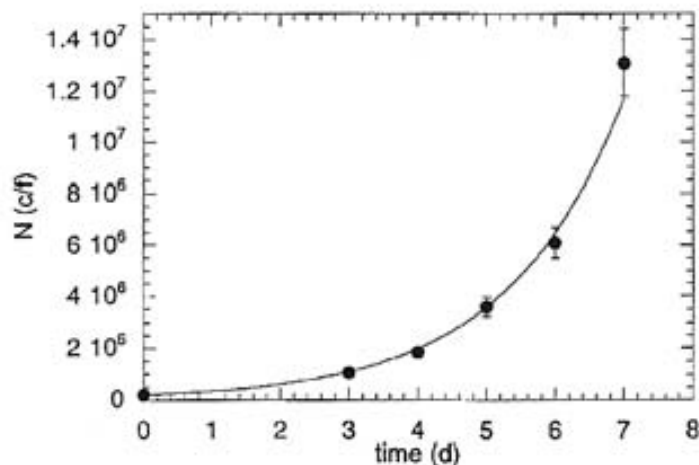


Figura 4.17: Corba de creixement de les cèl·lules HeLa emprades en els experiments de Rosi i col·laboradors (Rosi *et al.*, 1999)

Per altra banda, Iorio i col·laboradors (Iorio *et al.*, 2003) van descriure la variació en el contingut de lípids neutres en la línia HuT 78 de limfoblasts humans en situació control i després d'inducció d'apoptosi amb  $\alpha$ -Fas, però de manera relativa, ja que no correlacionen la intensitat de les bandes obtingudes en TLC d'extractes lipí-

dics amb el contingut de lípid neutre. De tota manera, els autors indiquen que els extractes estudiats contenien tots el mateix nombre de cèl·lules. D'aquesta manera és pot fer una comparació relativa entre les dades per les dues situacions estudiades i es comprova que hi ha un augment en la intensitat de les bandes entre cèl·lules control i tractades. Seria interessant poder comparar les dades de quantificació per DAG, ja que és l'únic grup que quantifica aquest lípid neutre, però probablement la resolució del sistema cromatogràfic emprat no permetia la bona separació de DAG i AGL ( taula 4.9).

El contingut de lípids en cèl·lules C6 ha esta determinat també per Krämer i col·laboradors (Krämer *et al.*, 2002). En aquest cas, extractes lipídics de cèl·lules C6, RBE4 i ECV304, emprades com a model de barrera hematoencefàlica, es van estudiar per TLC i cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Els autors mostraven que per les cèl·lules C6 el percentatge de lípids totals que representaven els TAG, els EstCol i el colesterol no variava significativament al llarg de la corba de creixement, mentre que es detectaven àcids grassos lliures, i el seu percentatge augmentava entre cèl·lules de dia 4 i dia 8 de cultiu, i tornava a disminuir per cèl·lules de dia 14 de cultiu. El sistema de separació per TLC, heptà: dietileter: àcid acètic (60:40:20) és lleugerament diferent a l'emprat en aquesta tesi, així com el sistema de tinció (acetat de coure 3% i àcid fosfòric 8%). L'extracció es realitza en tubs eppendorf amb cloroform:metanol, la qual cosa pot introduir, com ja s'ha descrit, contaminacions en els extractes que poguessin ser confoses amb àcids grassos lliures. Els autors no refereixen el nombre de cèl·lules emprades per realitzar els extractes, ni el pes del sediment cel·lular, ni els valors dels Rfs dels compostos separats per TLC. Tots aquest motius impedeixen la comparació entre les dades publicades per Krämer i col·laboradors (Krämer *et al.*, 2002) i les obtingudes en aquesta teís.

És interessant remarcar en aquest punt que en les quantificacions de lípids neutres en extractes lipídics de cèl·lules C6 per TLC no es detecten àcids grassos lliu-

| mostra   | metabòlit | valor promig                     | referència                       |
|--|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| fibroblasts 3T3  | TAG       | 88,8 $\mu$ grams / $10^8$ cèls.  | (Ferretti <i>et al.</i> , 1999)  |
|  | AGL       | 389 $\mu$ grams / $10^8$ cèls.   |                                  |
| fibroblasts 3T3 transformats <i>ras</i>                            | TAG       | 153,3 $\mu$ grams / $10^8$ cèls. |                                  |
|  | AGL       | 220,2 $\mu$ grams / $10^8$ cèls. |                                  |
| cèl·lules CHO  | TAG       | 190 $\mu$ grams / $10^8$         | (Mackinnon <i>et al.</i> , 1992) |
| cervell normal rata  | TAG       | 27 $\mu$ grams /gtf              | (Hakumaki <i>et al.</i> , 1999)  |
|  | AGL       | 53 $\mu$ grams /gtf              |                                  |
|  | EstChol   | 53 $\mu$ grams /gtf              |                                  |
| tumor BT4C no tractat  | TAG       | 162 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
|  | AGL       | 101 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
|  | EstChol   | 109 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
| tumor BT4C tractat 4 dies  | TAG       | 210 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
|  | AGL       | 194 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
|  | EstChol   | 184 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
| tumor BT4C tractat 8 dies  | TAG       | 84 $\mu$ grams /gtf              |                                  |
|  | AGL       | 130 $\mu$ grams /gtf             |                                  |
|  | EstChol   | 45 $\mu$ grams /gtf              |                                  |
| teixit adjacent a glioblastoma humà                                | EstChol   | 5850 $\mu$ grams /gtf            | (Slagel <i>et al.</i> , 1967)    |
| glioblastoma humà  | EstChol   | 18500 $\mu$ grams /gtf           |                                  |
| línia HuT 78 de limfoblast T humans                                | TAG       | 44 u.a./ $10^8$ cèls.            | (Iorio <i>et al.</i> , 2003)     |
|  | AGL+DAG   | 76 u.a./ $10^8$ cèls.            |                                  |
|  | EstChol   | 116 u.a./ $10^8$ cèls.           |                                  |
| línia HuT 78 de limfoblast T humans apoptòtiques per $\alpha$ -Fas | TAG       | 138 u.a./ $10^8$ cèls.           |                                  |
|  | AGL+DAG   | 176 u.a./ $10^8$ cèls.           |                                  |
|  | EstChol   | 192 u.a./ $10^8$ cèls.           |                                  |

Taula 4.9: Recull de dades de quantificació de lípids neutres en diferents sistemes cel·lulars. Abreviacions: gtf, grams de teixit fresc; u.a., unitats arbitràries de densitat òptica.



res. El llindar de detecció dels àcids grassos lliures en el nostre sistema és de 0,625  $\mu\text{g}$ , Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) van determinar en fibroblasts NIH-3T3 en fase exponencial tardana de creixement un contingut d'àcids grassos lliures de  $15,2 \pm 4,7 \text{ nmol} / 10^6 \text{ cèl·lules}$ . Aquesta dada es pot convertir a  $\mu\text{grams} / 10^8 \text{ cèl·lules}$ , emprant un pes molecular promig de 256 g/mol pels AGL (pes molecular de l'àcid palmític), obtenint un valor de  $389 \mu\text{grams AGL} / 10^8 \text{ cèl·lules 3T3}$ . Aquest valor es troba fins i tot per sobre del contingut en TAG descrit pels autors en el seu sistema.

Per altra banda, Hakumäki i col·laboradors (Hakumaki *et al.*, 1999), en la seva anàlisi per cromatografia gas-líquid d'extractes lipídics de tumors BT4C en rates tractats amb ganciclovir, no tractats i cervell normal, observen un contingut d'AGL molt proper al contingut de TAG. A més els autors destaquen el fet que en els espectres de  $^1\text{H-RMN}$  apareixen senyals que corresponen a àcids grassos polinsaturats, o PUFAs, (2,8 i 5,3 ppm) i que el percentatge d'àcids grassos polinsaturats, tant esterificats com lliures, que està al voltant del 15% en cervell normal en tumors BT4C no tractats i tumors BT4C tractats amb ganciclovir a dia 8, augmenta fins un 28% en TAG i EstChol per tumors tractats a dia 4. Els autors indiquen la possibilitat que l'activitat fosfolipasa A2 (que hidrolitza fosfolípids per la posició sn-2, alliberant àcids grassos i lisofosfolípid) sigui la responsable de l'aparició dels PUFAs en degradar fosfatidilcolina de membrana, ja que detecten també un augment en el quocient Liso-PtdChol/PtdChol en aquests tumors.

Aquesta diferència entre altres sistemes cel·lulars i les cèl·lules C6 en la detecció d'AGL podria ser deguda a processos metabòlics diferents en aquests sistemes (degradació de fosfolípids per enzims diferents, síntesi d'àcids grassos més activa) que conduïssin a un major contingut d'aquest compost en altres sistemes cel·lulars.

Finalment, pel que fa al compost d' $R_f = 0,696$ , alguns autors n'havien detectat la presència en les TLCs d'extractes cel·lulars (Hirakawa *et al.*, 1991; Iorio *et al.*, 2003;

Sathasivam *et al.*, 2003), però no havia estat caracteritzada i analitzada. El compost analitzat seria del tipus 1-O-palmitil-2,3-dipalmitoil-rac-glicerol, emprat com a estàndard en els nostres experiments. Aquest compost tindria el seu origen en els plasmalògens, un tipus d'éter fosfolípids que representa el 18% dels fosfolípids en humans, tot i que el contingut en teixits concrets varia (Nagan & Zoeller, 2001). Són molt comuns en el sistema nerviós central humà (Slagel *et al.*, 1967), on representen fins a 2/3 dels fosfolípids d'etanolamina. Els plasmalògens tenen una estructura del tipus alquilacil-grup polar o bé alquenilacil-grup polar ( figura 4.18). Si sobre aquest compost hi actua l'enzim fosfolipasa C, s'allibera el grup polar i dona lloc al compost alquilacil-glicerol o alquenilacil-glicerol. La reesterificació d'un àcid gras en posició 3 del glicerol donaria lloc a un compost 1-alquil-2,3-acil-glicerol, com l'éter de diacilglicerol emprat com estàndard. Per tant, la presència d'aquest compost en els nostres extractes podria estar d'acord amb què els plasmalògens fossin un component important en la membrana de les cèl·lules C6, i la seva degradació podria tenir significat funcional a les cèl·lules C6. Aquests compostos tenen un paper important en la dinàmica de les membranes cel·lulars. Permeten a les membranes adoptar estructures diferents de la bicapa lipídica, i això sembla que podria tenir rellevància en processos de fusió de membrana, com per exemple la secreció. Per tant, els plasmalògens podrien tenir un paper important en la formació de les gotícules lipídiques en les cèl·lules C6.

## 4.3 Experiments d'RMN monodimensional de $^1\text{H}$

### 4.3.1 Estàndards

Es van obtenir espectres monodimensionals de  $^1\text{H}$ -RMN de compostos estàndard que volien ser estudiats en els extractes lipídics. Es van assignar els senyals dels espectres segons la bibliografia (Henke *et al.*, 1996) i aquesta informació es va emprar

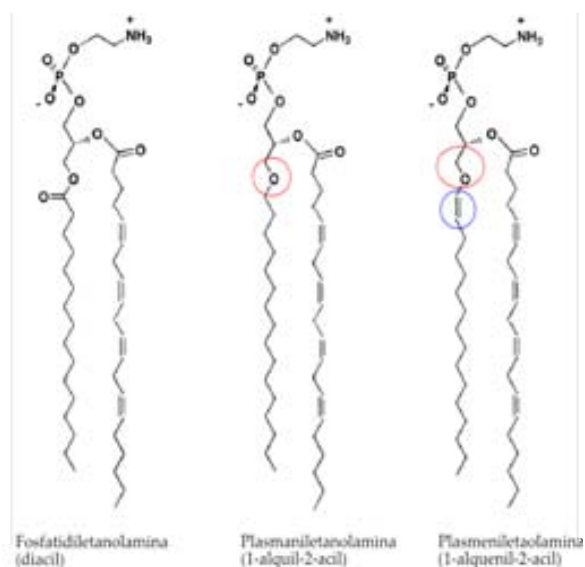


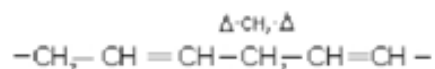
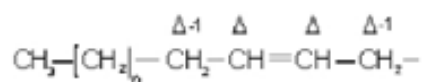
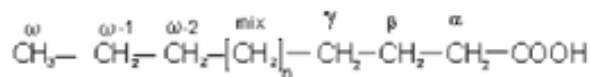
Figura 4.18: Estructura química dels plasmalògens comparada amb la dels fosfolípids d'origen. En vermell es marca l'enllaç éter i en blau el doble enllaç extra. Figura extreta de (Nagan & Zoeller, 2001).

per assignar els espectres dels extractes. A la figura 4.19 es mostren les estructures químiques dels compostos estudiats i la nomenclatura emprada. A la figura 4.20 es mostra un espectre de tripalmitin. La regió ampliada correspon als senyals dels metils del grup glicerol.

### 4.3.2 Cèl·lules C6 intactes

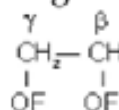
Es van realitzar experiments de <sup>1</sup>H-RMN amb sediments de cèl·lules C6 intactes (figura 4.21). Es van obtenir experiments de puls i adquisició i d'eco d'espín ( $T_e = 136$  ms) de cèl·lules de dia 4, de dia 7, de dia 7 incubades amb ACSF i de dia 7 tractades amb staurosporina, per mesurar i calcular les variacions relatives dels senyals de lípids mòbils. En el patró espectral de les cèl·lules C6 s'observen senyals a 0,93 ppm, corresponents al metil terminal de cadenes d'àcid gras, i a 1,28 ppm, corresponents a grups metilè de cadenes d'àcid gras (Barba *et al.*, 1999). S'observen també altres metabòlits, alguns dels quals es troben assignats en la taula 4.10. Els quocients entre l'alçada del senyal de lípids mòbils i el senyal de creatina van ser calculat per cada cas, tant pels experiments de puls i adquisició com pels d'eco d'espín (taula 4.11). Si

## 1-Àcids grassos (F)

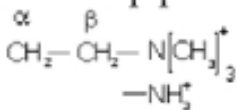


## 2-Fosfolípids (PL)

## Esquelet glicerol (Glyc)

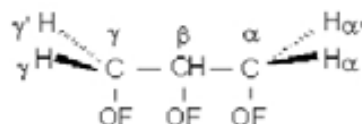
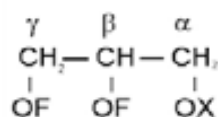


## Grup polar



Colina (PtC)  
Etanolamina (PtE)

## 3-Lípids neutres



Si X=H Diacilglicerol (DAG)    Si X=F Triacilglicerol (TAG)

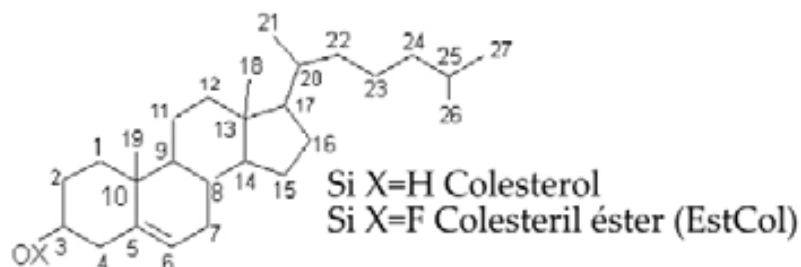


Figura 4.19: Estructura química i nomenclatura emprada en els principals lípids estudiats en aquesta tesi.

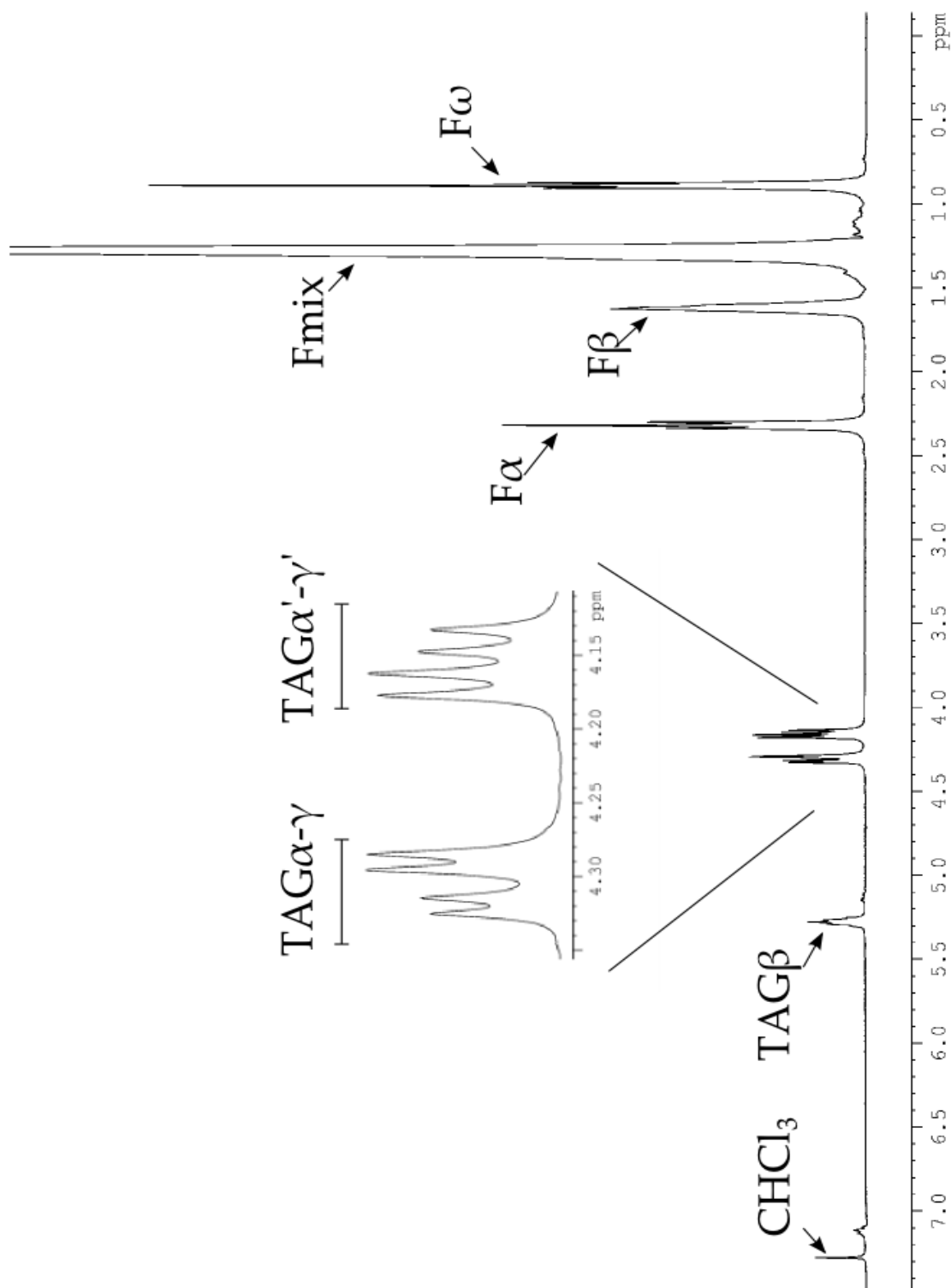


Figura 4.20: Espectre de 1D-<sup>1</sup>H-RMN del compost tripalmitin a una concentració de 10mg/ml en CDCl<sub>3</sub>. Es mostra ampliada la regió dels metils del glicerol. Les abreviacions corresponen a les de la figura 4.19

| Desplaçament | Assignació                            | Abreviacions<br>figura 4.21 |
|--------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 0,90         | metil terminal de cadenes d'àcid gras | Lip 1                       |
| 1,28         | metilens de cadenes d'àcid gras       | Lip 2                       |
| 3,03         | creatina                              | Cr1                         |
| 3,18-3,22    | grups trimetilamina                   | TMA                         |
| 3,95         | creatina                              | Cr2                         |

Taula 4.10: Assignacions dels senyals observats en experiments d' $1D$ - $^1H$ -RMN d'eco d'espín ( $T_e = 136$  ms) de sediments de cèl·lules C6

tenim en compte que la concentració de creatina és constant al llarg de la corba de creixement de les cèl·lules C6 (Valverde *et al.*, 2006), podem considerar els canvis en els quocients lípids mòbils/creatina (ML/Cre) com deguts a canvis en la intensitat dels senyals de ML.

En els experiments d'eco d'espín el quocient entre el senyal de creatina a 3,03 ppm i el de trimetilamina a 3,22 ppm (TMA, que en les cèl·lules C6 té com a principals contribuents fosfocolina i glicerofosfocolina) no varia significativament entre les tres situacions estudiades o amb la incubació amb staurosporina. Per altra banda, el quocient entre els senyals de ML i el de creatina a 3,03 ppm augmenta significativament entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7. El quocient entre els ML a 1,28 ppm i el senyal dels grups TMA a 3,22 ppm també augmenta entre aquestes dues situacions. Es detecten canvis significatius entre cèl·lules de dia 7 i de dia 7 incubades amb ACSF, amb un augment de 9 cops en el quocient 1,28/3,03. De tota manera, el rang d'augment màxim es troba entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF, amb un augment de 29,7 vegades en el quocient 1,28/3,03 ppm. Aquests resultats indicarien un increment aparent en el contingut de ML entre les tres situacions estudiades.

Els espectres de puls i adquisició presenten una reducció dels augments relatius dels ML respecte de les dades obtingudes pels experiments d'eco d'espín pel quocient

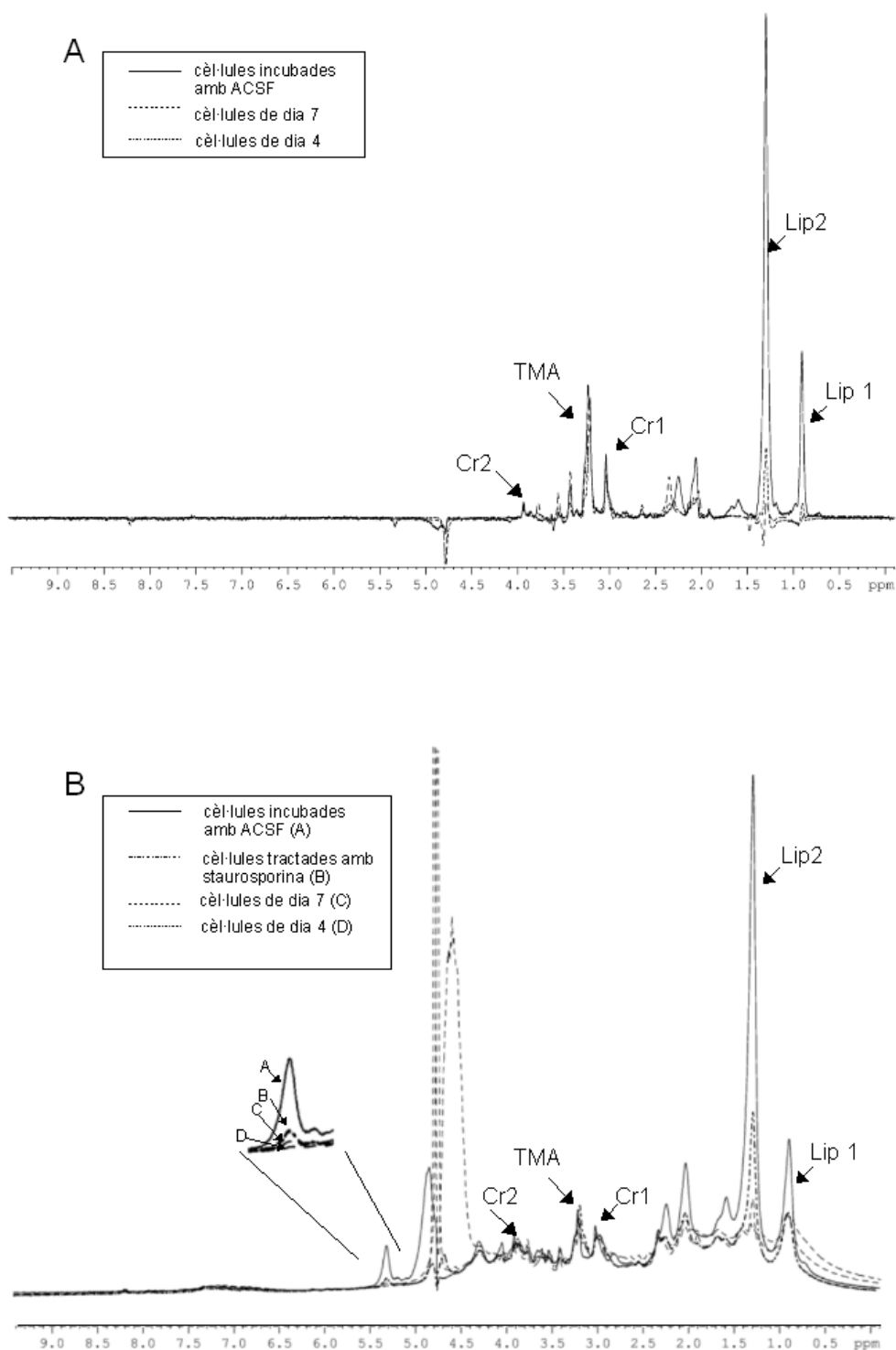


Figura 4.21: Espectres de A- espin eco ( $T_e = 136$  ms) i B- puls i adquisició de 1D-<sup>1</sup>H-RMN de cèl·lules C6 en les diferents fases d'estudi. Es mostra una expansió de la regió a 5,3 ppm insertada en la figura B. Assignacions: Cr1, creatina a 3,03 ppm; Cr2, creatina a 3,95 ppm; Lip1, grup metil dels lípids mòbils a 0,9 ppm; Lip2, grup metilè dels lípids mòbils a 1,33 ppm; Lac, lactat; TMA: grups trimetilamina a 3,18-3,22 ppm. Els espectres es van escalar a alçada de Cr a 3,03 ppm constant. Veure també la taula 4.10.

1,28/3,03 (fins a 8,6 vegades d'augment entre cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF). Aquesta disminució pot ser causada, entre d'altres motius, per pèrdues de ressonàncies de  $T_2$  molt curts les quals no varien essencialment la seva contribució a l'espectre al llarg de la corba de creixement o per incubació amb ACSF, i que no són visibles a 136 ms de temps d'eco.

En els espectres de puls i adquisició, el quocient entre el senyal a 1,28 ppm, corresponent als metilens dels àcids grassos, i el senyal a 5,30 ppm, corresponent als dobles enllaços ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), augmenta de 6,2 (cèl·lules de dia 4) a 7,7 (cèl·lules de dia 7) a 17,2 (cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF). Aquestes dades semblen suggerir una possible disminució en el grau d'insaturació dels àcids grassos continguts en els ML. De tota manera, el quocient 5,30/3,03 ppm no varia entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7, i presenta un augment no significatiu entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 incubades amb ACSF, suggerint per contra que no es produeix cap disminució en el grau d'insaturació, o fins i tot un lleuger augment, respecte de la situació a dia 4 de cultiu.

El tractament amb staurosporina produeix un patró espectral intermedi entre les cèl·lules de dia 7 i les de dia 7 incubades amb ACSF, excepte pel quocient 3,03/3,22ppm que disminueix en els experiments d'eco d'spin per sota dels valors obtinguts per les cèl·lules de dia 4. La intensitat dels senyals corresponents al metilè d'àcids grassos poliinsaturats a 2,8 ppm ( $-\text{CH}=\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) és més baixa per cèl·lules de dia 4 i incubades amb ACSF, i augmenta en cèl·lules de dia 7 i tractades amb staurosporina encara que de manera no significativa. A més, àcids grassos mono-i poliinsaturats contribueixen al senyal a 5,3 ppm. El valor del quocient 5,3/3,03 és molt similar per cèl·lules de dia 4 i de dia 7. Es detecta un augment en aquest quocient de fins a 3 vegades en cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF respecte de cèl·lules de dia 4 i dia 7, però l'apoptosi no sembla fer augmentar el quocient 5,30/3,03 en les cèl·lules C6 tractades amb staurosporina, ja que el quocient sembla mantenir-se als nivells de



| experiments<br>d'eco d'espín           |  |   |   |   |
|--|--|---|---|---|
| quocient entre<br>les alçades          | cèl·lules<br>dia 4 de cultiu<br>(n=11) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>(n=9) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>incubades amb<br>ACSF (n=3) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>trac-<br>tades amb stau-<br>rosporina (n=3) |
| 0,90/3,03                              | 0,03± 0,02                             | 0,30 ± 0,17 <sup>a</sup>                    | 4,55± 1,92 <sup>bc</sup>  | 1,50± 0,86 <sup>def</sup>   |
| 1,28/3,03                              | 0,43± 0,19                             | 1,43 ± 1,0 <sup>a</sup>                     | 12,78± 4,46 <sup>bc</sup>   | 4,63± 2,17 <sup>def</sup>   |
| 1,28/3,22                              | 0,18± 0,12                             | 0,81± 0,39 <sup>a</sup>                     | 3,68± 0,37 <sup>bc</sup>  | 0,80±0,32 <sup>def</sup>  |
| 3,03/3,22                              | 0,37±0,17                              | 0,69 ± 0,35                                 | 0,32± 0,16  | 0,18±0,01   |
| experiments<br>de puls i<br>adquisició |  |   |   |   |
| quocient entre<br>les alçades          | cèl·lules<br>dia 4 de cultiu<br>(n=11) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>(n=9) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>incubades amb<br>ACSF (n=3) | de<br>cèl·lules<br>dia 7 de cultiu<br>trac-<br>tades amb stau-<br>rosporina (n=3) |
| 1,28/0,90                              | 0,98 ± 0,43                            | 1,64 ± 0,84                                 | 3,93±0,39 <sup>bc</sup>   | 1,79±0,26 <sup>df</sup>   |
| 0,90/3,03                              | 0,95 ± 0,36                            | 1,22 ± 0,44                                 | 2,83±0,43 <sup>bc</sup>   | 1,46±0,94 <sup>df</sup>   |
| 1,28/3,03                              | 1,30 ± 0,53                            | 1,93 ± 1,16 <sup>a</sup>                    | 11,17±2,22 <sup>bc</sup>  | 2,73±2,07 <sup>df</sup>   |
| 1,28/3,22                              | 0,96 ± 0,30                            | 1,62 ± 0,09 <sup>a</sup>                    | 7,97±2,45 <sup>bc</sup>   | 1,74±0,76 <sup>df</sup>   |
| 5,30/3,03                              | 0,21 ± 0,12                            | 0,25 ± 0,04                                 | 0,65±0,03 <sup>√</sup>  | 0,25 *  |
| 2,80/3,03                              | 0,97 ± 0,40                            | 1,56 ± 0,52                                 | 0,74±0,20   | 2,67±2,95   |
| 3,03/3,22                              | 0,75 ± 0,21                            | 0,87 ± 0,24                                 | 0,71±0,13   | 0,73±0,30   |

Taula 4.11: Quocients entre les alçades dels senyals d'interès calculades a partir dels espectres de 1D-<sup>1</sup>H-RMN. Diferències estadísticament significatives entre <sup>a</sup> dia 4 i dia 7 <sup>b</sup> cèl·lules de dia 4 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF <sup>c</sup> dia 7 i cèl·lules de dia 7 incubades amb ACSF <sup>d</sup> cèl·lules de dia 7-staurosporina i dia 4 <sup>e</sup> cèl·lules de dia 7-staurosporina i dia 7 <sup>f</sup> cèl·lules de dia 7 staurosporina i dia 7 -ACSF. \* n=1 i <sup>√</sup> n=2 per aquests experiments, degut a que la pobra supressió de l'aigua no va permetre calcular aquests quocients en altres experiments.

cèl·lules de dia 4 i dia 7 ( n = 1).

### 4.3.3 Extractes lipídics de cèl·lules C6

Es van obtenir espectres d'1D-<sup>1</sup>H-RMN de puls i adquisició de tots els extractes lipídics de cèl·lules que es van realitzar, per intentar quantificar el contingut de TAG. Com es pot veure a la figura 4.22, en la regió entre 3,5 i 4,5 es troben solapats molts senyals, que corresponen als senyals dels protons del glicerol de triacilglicerols, diacilglicerols i fosfolípids (per assignacions veure taula 4.12; per nomenclatura veure

figura 4.19). Donat que aquests eren els senyals d'interès per l'anàlisi quantitativa, i que no era possible separar-los per aquesta tècnica en les nostres condicions experimentals, es va optar per realitzar experiments d'RMN bidimensional heteronuclear (secció 4.5).

#### 4.3.4 Discussió dels resultats d'RMN monodimensional de $^1\text{H}$

Els resultats mostren un augment en el contingut relatiu de ML respecte de la creatina en cèl·lules C6 ATCC intactes entre dia 4 i dia 7 o dia 7 amb ACSF. El contingut de creatina s'ha demostrat que no presenta variacions estadísticament significatives en les cèl·lules C6 entre les fases exponencial i postconfluent, mitjançant extractes amb àcid perclòric (Valverde *et al.*, 2006). Per tant, podem considerar que l'augment en els quocients dels senyals de ML respecte de creatina correspondria a un augment en els ML detectables. Aquest augment és estadísticament significatiu i està qualitativament d'acord amb resultats previs del grup obtinguts en cèl·lules C6 ECACC (Barba *et al.*, 1999). La incubació de les cèl·lules C6 amb ACSF provoca un efecte d'augment de la intensitat dels senyals de ML encara més acusat, d'acord amb dades prèvies del grup per cèl·lules C6 perfundides (Barba *et al.*, 2001). S'assoleix un augment màxim de 29,7 vegades en el cas del senyal del metilè de la cadena d'àcid gras (1.28 ppm/3.03 ppm) quan es compara la intensitat d'aquest senyal entre cèl·lules de fase exponencial de dia 4 de cultiu amb les cèl·lules de fase post-confluent de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF.

Els resultats referents al grau d'insaturació semblen ser contradictoris. Mentre augmenta el quocient 1,28/5,03, indicant disminució del grau d'insaturació, el quocient 5,03/3,03 es manté constant. Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) van descriure resultats similars per fibroblasts NIH 3T3 i 3T3ras. Cal tenir en compte que els quocients d'intensitat aparents dels ML poden estar afectats no només pel grau d'insaturació de l'àcid gras, sino també per la mobilitat d'aquestes cadenes, de

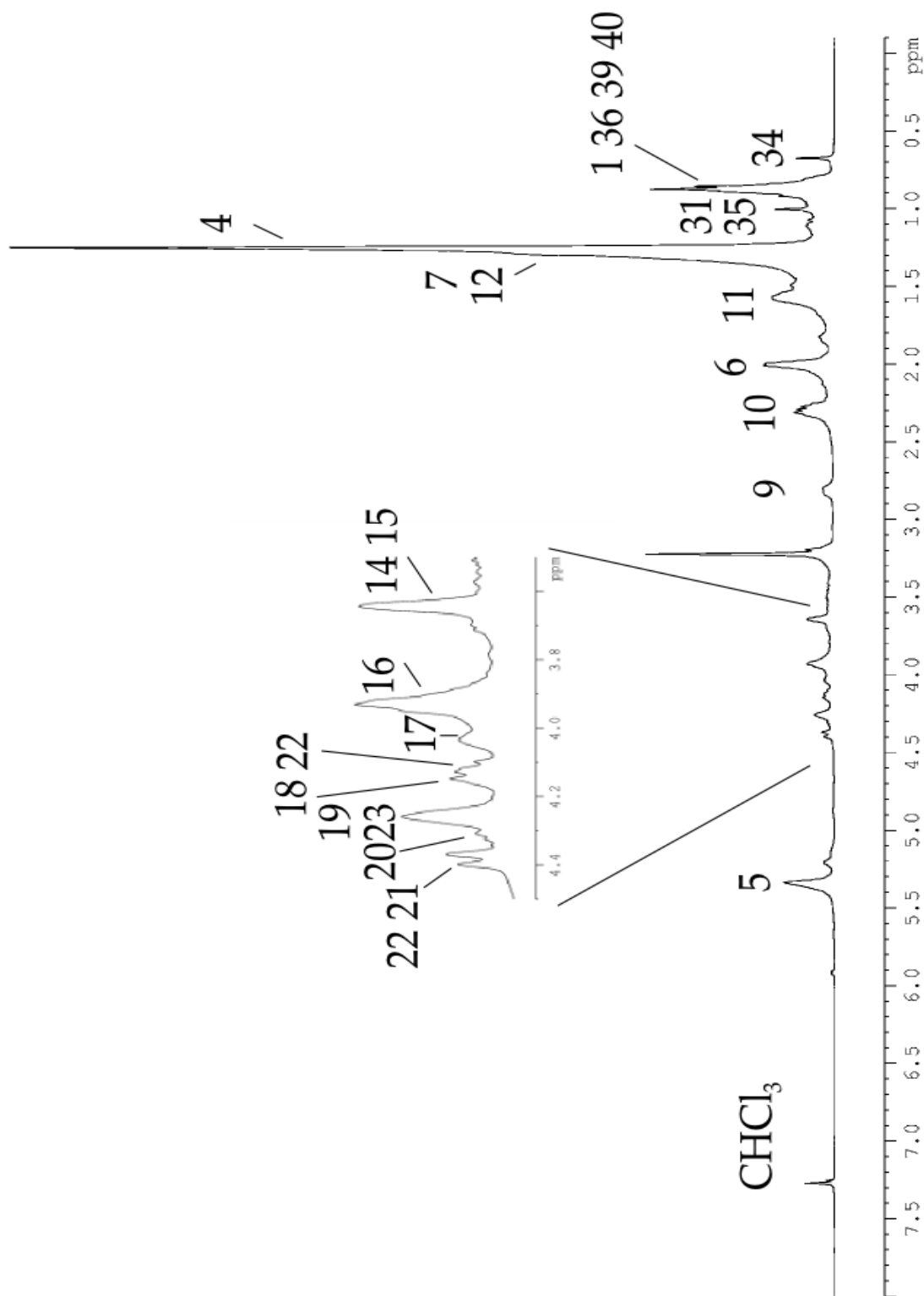


Figura 4.22: Espectre de 1D-<sup>1</sup>H-RMN d'un extracte lipídic de cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu, en CDCl<sub>3</sub>. L'ampliació correspon a la regió dels protons α i γ del glicerol dels TAG i α del glicerol dels fosfolípids. Per assignacions, veure la taula 4.12

manera que els resultats es podrien explicar per una variació en la mobilitat dels àcids grassos al llarg de la corba de creixement. Per tant, els augments detectats en els quocient dels ML per cèl·lules de dia 4, dia 7 i dia 7 incubades amb ACSF semblen apuntar cap a un augment aparent del contingut de ML al llarg de les tres situacions. **Aquest augment que és de fins a 29,7 vegades no pot ser explicat per els augments observats en la quantificació de lípids neutres per TLC (augment d'1,5 vegades com a màxim).**

Els experiments d' $1D-^1H$ -RMN d'extractes lipídics de cèl·lules C6 no presentaven la resolució suficient com per ser utilitzats per al quantificació de TAG. Tot i que altres autors han emprat la  $1D-^1H$ -RMN per la quantificació de TAG en extractes lipídics (Rosi *et al.*, 1999), en el nostre sistema d'estudi el solapament dels senyals provinents dels  $^1H$  del glicerol tant de TAG i DAG com de PL, com es mostra a la figura 4.22, va evidenciar el fet que aquest tipus d'experiment no ens permetia la quantificació de TAG. Possiblement el mètode d'extracció emprat per Rosi i col·laboradors (Rosi *et al.*, 1999), en què es duia a terme primer una extracció amb àcid perclòric de les cèl·lules i sobre el sediment cel·lular es realitzava una extracció amb cloroform:metanol per obtenir l'extracte lipídic, permetria una millor separació dels senyals en la regió entre 4 i 5 ppm en els espectres de  $1D-^1H$ -RMN. També seria possible que el compost de  $R_f = 0,696$  estigués interferint en la regió dels glicerols dels espectres del nostre sistema d'estudi, provocant una major dificultat en la resolució del senyals. El mètode escollit per la quantificació absoluta als extractes va ser doncs la cromatografia en capa prima, com es descriu a la secció 4.2.

## 4.4 Experiments d'RMN monodimensional de $^{13}\text{C}$

### 4.4.1 Estàndards

Es van obtenir espectres dels compostos estàndard que es volien posteriorment identificar en els extractes. A la figura 4.23 es mostra l'espectre d'una dissolució de tripalmitin 10 mg/ml en  $\text{CDCl}_3$ . La informació obtinguda es va emprar per assignar els espectres dels extractes. Les assignacions es troben recollides a la taula 4.12. A la figura 4.19 es mostren les estructures químiques dels compostos estudiats i la nomenclatura emprada.

Taula 4.12: Assignacions temptatives dels extractes lipídics de cèl·lules C6 a partir dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i  $^{13}\text{C}$ -RMN dels estàndards assignats ( seccions 4.3.1 i 4.4.1) i (Henke *et al.*, 1996). La columna Numeració indica la numeració emprada per assignar els espectres que es mostren. Per nomenclatura, veure la figura 4.19

| Assignació          | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ ppm | Numeració |
|---------------------|-----------------------|------------------|-----------|
| cadenes d'àcid gras |                       |                  |           |
| $F_\omega$          | 14                    | 0,89             | 1         |
| $F_{\omega-1}$      | 22,8                  | 1,27             | 2         |
| $F_{\omega-2}$      | 32                    | 1,27             | 3         |
| $F_{mix}$           | 29,8                  | 1,27             | 4         |
| $F_\Delta$ monoin-  | 130,3                 | 5,35             | 5         |
| saturats            |                       |                  |           |

la taula continua a la pàgina següent

Taula 4.12: (continuació)

| Assignació                                     | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ ppm | Numeració |
|--|-----------------------|------------------|-----------|
| $F_{\Delta-1}$                                 | 27,2                  | 2,04             | 6         |
| $F_{\Delta-2}$                                 | 29,8                  | 1,35             | 7         |
| $F_{\Delta}$ poliinsa-                         | 129                   | 5,35             | 8         |
| turats   |                       |                  |           |
| $\Delta\text{-CH}_2\text{-}\Delta$             | 26,4                  | 2,82             | 9         |
| $F_{\alpha}$                                   | 34,2                  | 2,3              | 10        |
| $F_{\beta}$                                    | 25,6                  | 1,6              | 11        |
| $F_{\gamma}$                                   | 29,8                  | 1,35             | 12        |
| esquelet glicerol i cap polar dels fosfolípids |                       |                  |           |
| $\text{N}(\text{CH}_3)_3$                      | 54,35                 | 3,21             | 13        |
| $\text{PtC}_{\beta}$                           | 66,9                  | 3,67             | 14        |
| $\text{DAG}_{\alpha}$                          | 61,7                  | 3,64             | 15        |
| $\text{Glyc}_{\alpha}$                         | 63,7                  | 3,96             | 16        |
| $\text{PtE}_{\alpha}$                          | 62,4                  | 4,06             | 17        |
| $\text{TAG}_{\alpha'-\gamma'}$                 | 62,2                  | 4,15             | 18        |
| $\text{DAG}_{\gamma}$                          | 63,1                  | 4,26             | 19        |
| $\text{TAG}_{\alpha-\gamma}$                   | 62,2                  | 4,31             | 20        |
| $\text{DAG}'_{\gamma}$                         | 63,1                  | 4,36             | 21        |
| $\text{Glyc}_{\gamma}$                         | 62,8                  | 4,14+4,38        | 22        |
| $\text{PtC}_{\alpha}$                          | 59,12                 | 4,25             | 23        |
| $\text{DAG}_{\beta}$                           | 72,6                  | 5,12             | 24        |
| $\text{Glyc}_{\beta}$                          | 70,4                  | 5,21             | 25        |
| $\text{TAG}_{\beta}$                           | 69                    | 5,28             | 26        |

la taula continua a la pàgina següent

Taula 4.12: (continuació)

| Assignació | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ ppm | Numeració |
|------------|-----------------------|------------------|-----------|
| Colesterol |                       |                  |           |
| C1         | 19,1                  | 1,15+1,87        | 27        |
| C2         | 31,6                  | 1,81+1,48        | 28        |
| C3         | 71,9                  | 3,46             | 29        |
| C4         | 42,5                  | 2,3              | 30        |
| C5         | 141,5                 | -                | 31        |
| C6         | 122                   | 5,34             | 32        |
| C7         | 32,4                  | 1,98             | 33        |
| C8         | 32,5                  | 1,49             | 34        |
| C9         | 50,70                 | 0,94             | 35        |
| C10        | 36,6                  | -                | 36        |
| C11        | 21,5                  | 1,50             | 37        |
| C12        | 39,6                  | 1,18+2,03        | 38        |
| C13        | 42,5                  | -                | 39        |
| C14        | 57,4                  | 1,02             | 40        |
| C15        | 24,8                  | 1,60+1,08        | 41        |
| C16        | 28                    | 1,27+1,85        | 42        |
| C17        | 56,2                  | 1,11             | 43        |
| C18        | 11,8                  | 0,70             | 44        |
| C19        | 19,1                  | 1,02             | 45        |
| C20        | 36,3                  | 1,39             | 46        |
| C21        | 19,3                  | 0,92             | 47        |
| C22        | 36,1                  | 1,18+1,35        | 48        |

la taula continua a la pàgina següent

Taula 4.12: (continuació)

| Assignació | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ ppm | Numeració |
|------------|-----------------------|------------------|-----------|
| C23        | 24,4                  | 1,35+1,15        | 49        |
| C24        | 39,6                  | 1,14             | 50        |
| C25        | 28                    | 1,55             | 51        |
| C26        | 22,8                  | 0,87             | 52        |
| C27        | 23,2                  | 0,88             | 53        |
| Colesterol |                       |                  |           |
| EstCol2    | 28,3                  | 1,61             | 54        |
| EstCol3    | 74,7                  | 4,56             | 55        |
| EstCol4    | 38,8                  | 2,32             | 56        |

#### 4.4.2 Extractes lipídics de cèl·lules C6

Es van obtenir espectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu ( $n=3$ ), i de cèl·lules de dia 7 de cultiu tractades amb  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa durant 48 h (entre els dies 5 i 7 de cultiu) ( $n=3$ ). A la figura 4.24 es mostra un espectre d'abundància natural de cèl·lules de dia 7 i un espectre de cèl·lules de dia 7 de cultiu marcades amb  $^{13}\text{C}$  durant 48 h.

En els espectres d'1D-RMN de  $^{13}\text{C}$  d'extractes de cèl·lules es van integrar les àrees dels senyals d'interès amb el programa XWinNMR i es van calcular els quocients respecte de la integral del senyal de colina. Els resultats es mostren a la taula 4.13. Com es pot comprovar en la figura 4.24, el senyal  $\text{Glyc}_\alpha$  dels fosfolípids presenta un clar augment en la intensitat en els experiments de marcatge. Com es mostra a la taula 4.13 la intensitat del senyal del carboni  $\text{Glyc}_\alpha$  augmenta unes 14 vegades respecte del senyal en abundància natural, considerant la fosfatidilcolina constant



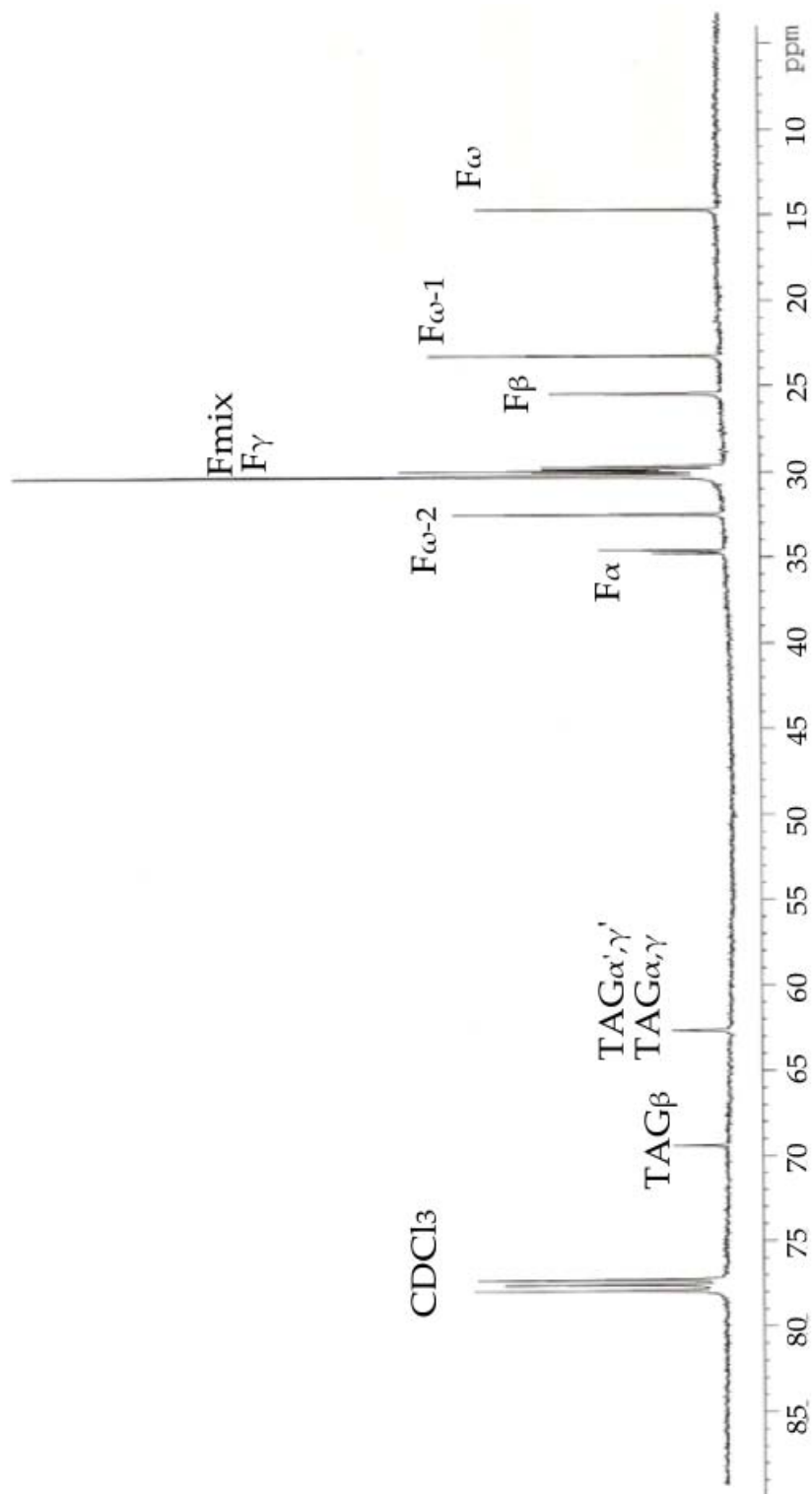


Figura 4.23: Espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN de tripalmitin a una concentració de 10mg/ml en  $\text{CDCl}_3$ . Les abreviacions corresponen a les de la figura 4.19

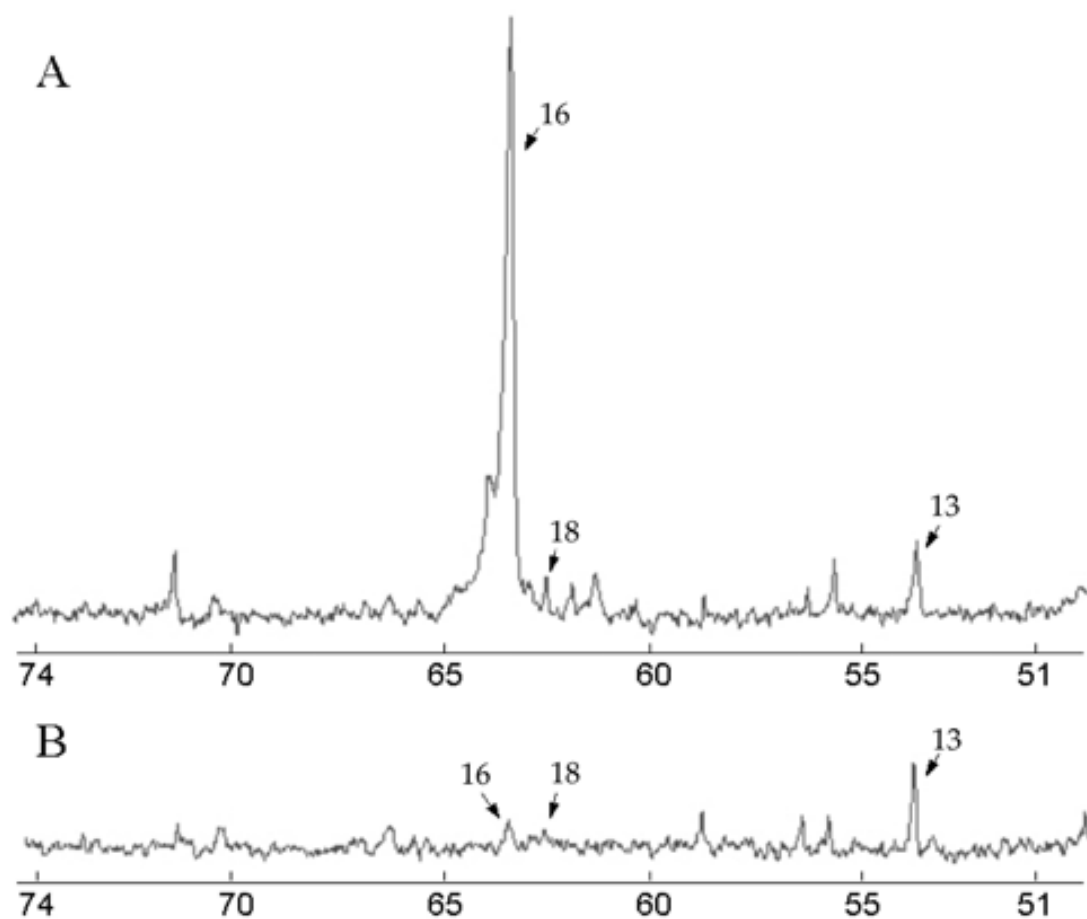


Figura 4.24: Fragments dels espectres d'RMN monodimensional de  $^{13}\text{C}$  d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu. A- cèl·lules incubades 48 h amb  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa, B- cèl·lules no marcades. Les assignacions són segons la taula 4.12 13-senyal del grup trimetilamina de la fosfatidilcolina a 54,3 ppm 16-senyal de fosfolípids  $Glyc_{\alpha}$  a 63,8 ppm, 18- senyal dels  $TAG_{\alpha-\gamma}$  a 62,2 ppm.

El senyal dels  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  i dels  $TAG_{\alpha-\gamma}$  (genèricament en aquesta secció  $TAG_{\alpha-\gamma}$ ) presenta un augment només d'1,8 vegades entre els experiments d'abundància natural i marcatge. El senyal que correspon als metils dels àcids grassos  $F_{\omega}$  presenta un augment en el quocient amb colina de 7,7 vegades entre abundància natural i marcatge.

| Senyal                | Intensitat en experiments d'abundància natural/ colina (n=3) | intensitat en experiments de marcatge /colina (n=3) | augment relatiu de la intensitat (marcatge/ abundància natural) |
|-----------------------|--|---|---|
| $TAG_{\alpha-\gamma}$ | 0,14±0, 11   | 0,25±0, 18  | 1,8   |
| $Glyc_{\alpha}$       | 0,78±0, 45   | 11,05±3, 3  | 14,2  |
| $F_{\omega}$          | 1,99±0, 39   | 15,40±3, 67   | 7,7   |

Taula 4.13: Variacions en la intensitat dels senyals deguda a l'enriquiment amb  $^{13}\text{C}$  en els espectres d'1D- $^{13}\text{C}$ -RMN d'extractes de cèl·lules C6 de dia 7 de cultiu.

#### 4.4.3 Discussió dels resultats d'RMN monodimensional de $^{13}\text{C}$

Els resultats que es mostren a la taula 4.13 indicaven que el marcatge era més intens en el glicerol dels PL, i suggerien que l'esquelet glicerol dels PL sintetitzats *de novo* en aquestes condicions de cultiu provenien principalment de glucosa marcada. La menor incorporació de marcatge en TAG i AG fèien pensar en la possibilitat d'intervenció de precursors "freds" en la síntesi d'aquests compostos.

La comparació dels espectres d' 1D- RMN de  $^{13}\text{C}$  dels extractes lipídics de cèl·lules de dia 7 de cultiu (n=3) amb els de cèl·lules de dia 7 de cultiu tractades amb [1]- $^{13}\text{C}$ -glucosa durant 48 h (entre els dies 5 i 7 de cultiu) (n=3) mostra una clara incorporació del marcatge en PL, ja que el quocient carboni  $Glyc_{\alpha}$ /colina augmenta 14,2 vegades respecte del quocient en abundància natural, i és 44,2 vegades el quocient carbonis  $TAG_{\alpha-\gamma}$ /colina en experiments de marcatge (veure la figura 4.19 per les assignacions dels senyals, i la taula 4.13). Tenint en compte que el marcatge es va fer incubant les cèl·lules 48 h amb  $^{13}\text{C}$  entre els dies 5 i 7 de la corba de creixement, això podria interpretar-se com que durant aquesta fase de la corba encara hi ha un cert nombre de cèl·lules en duplicació, és a dir sintetitzant PL, suficient com per explicar aquest augment d'intensitat en el senyal dels PL. Concretament, si tenim en compte que el nombre de cèl·lules entre dia 5 i dia 7 es multiplica per 1,4 (veure figura 4.1), les dades indicarien que un 22% de les cèl·lules de dia 5 de cultiu s'estarien encara dupli-

cant. Aquestes cèl·lules incorporarien  $^{13}\text{C}$  provinent de la glucosa marcada als seus PL. Tenint en compte que la glucosa està enriquida en un 99,9% en  $^{13}\text{C}$ , si tots els PL provinguessin d'aquesta glucosa, només un 50% quedaria marcat. Aquests PL donarien lloc a un augment màxim en la intensitat del senyal  $Glyc_{\alpha}$  de 12 vegades. Aquest valor, tot i ser una mica inferior a l'augment experimental trobat (augment de 14,4 vegades) es troba en el mateix ordre de magnitud. Per tant, l'augment en la intensitat del senyal del carboni  $Glyc_{\alpha}$  de PL podria ser explicat per la proliferació cel·lular.

El percentatge de cèl·lules en proliferació a dia 5 estaria d'acord amb les dades de la taula 4.3, on es mostra una disminució del nombre de cèl·lules en fase S del cicle cel·lular entre cèl·lules de dia 4 (20,9 %  $\pm$  1,2 %) i cèl·lules de dia 7 (6,0%  $\pm$  0,6 %). Les cèl·lules de dia 5 són un punt intermig entre dia 4 i dia 7, per tant el nombre de cèl·lules en proliferació és menor que a dia 4 però major que a dia 7 de cultiu.

L'augment en el quocient  $F_{\omega}$  (carboni  $\omega$  dels àcids grassos)/colina és només de 7,7 vegades respecte del quocient en experiments d'abundància natural. Aquest augment menys significatiu en la intensitat del senyal fa pensar en la possibilitat d'una entrada de precursors "freds" als àcids grassos de PL i lípids neutres.

Finalment, en el cas dels  $TAG_{\alpha-\gamma}$ , podem fer el mateix raonament que en el cas dels PL. Tenint en compte que el contingut en TAG no varia per les cèl·lules C6 al llarg de la corba de creixement, per mantenir constant aquest contingut caldria que se sintetitzessin TAG. Si les cèl·lules en proliferació incorporeessin  $^{13}\text{C}$  provinent de la glucosa per sintetitzar TAG, l'augment màxim en la intensitat del senyal de  $TAG_{\alpha-\gamma}$  també hauria de ser de 12 vegades, però en aquest cas tenim un augment experimental d'1,8 vegades, un ordre de magnitud inferior al màxim esperat. Aquesta diferència fa pensar en l'entrada de precursors freds en la síntesi de TAG entre dia 5 i 7 de cultiu.

Podem fer una aproximació tenint en compte el volum de gotícules en cada fase

de creixement. Tot i que no s'ha mesurat el volum de gotícules lipídiques en cèl·lules de dia 5, podem assumir que no variarà substancialment del volum en cèl·lules de dia 4, segons la informació de la figura 4.2. El volum promig de gotícules passa de  $0,39 \times 10^{-3}$  pl en cèl·lules de dia 4 a  $3,43 \times 10^{-3}$  en cèl·lules de dia 7. Considerant els TAG el component principal de les gotícules, si la diferència de volum vingués de síntesi directa de TAG a partir de  $^{13}\text{C}$ -glucosa, llavors  $1,51 \times 10^{-3}$  pl de gotícula (la meitat dels pl sintetitzats *de novo*) haurien incorporat  $^{13}\text{C}$ , i sabent que  $0,004 \times 10^{-3}$  pl estarien marcats en els TAG inicials (l'abundància natural del  $^{13}\text{C}$  és 1,1%), l'augment esperat en la intensitat dels senyals de  $^{13}\text{C}$ -RMN dels  $\text{TAG}_{\alpha-\gamma}$  seria 381 vegades. Com mostren les dades de  $^{13}\text{C}$ -RMN, el senyal dels  $\text{TAG}_{\alpha-\gamma}$  augmenta 1.8 vegades, dos ordres de magnitud per sota del valor teòric calculat, reforçant la idea que **en la síntesi dels TAG intervenen precursors no marcats**.

Els experiments de 1D- $^{13}\text{C}$ -RMN presenten el greu desavantatge de ser poc sensibles (fins a 48 hores d'adquisició per espectre) i per tant no permetien detectar amb molta sensibilitat els canvis en el marcatge dels diferents carbonis de les mostres, especialment aquells que incorporen menys marcatge i que són d'especial interès en aquesta tesi, els senyals dels TAG. Per tant es va decidir cercar una altra tècnica més sensible a aquests canvis, i es va optar per continuar els estudis amb experiments de RMN bidimensional (veure secció 4.5).

## 4.5 Experiments d'RMN bidimensional

### 4.5.1 Estàndards

Es van obtenir espectres 2D-RMN del tripalmitin, dipalmitin, PtdCho, PtdEtAmina i colesterol, estàndards dels compostos que es volien estudiar en els extractes. Els experiments realitzats van ser tant de correlació homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com de correlació heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Els espectres es van assignar amb la informació obtinguda

a partir dels espectres modonimensionals i bidimensionals dels estàndards i dades de la literatura (Henke *et al.*, 1996). Les assignacions es troben recollides a la taula 4.12. La figura 4.25 mostra un espectre HMQC complet d'una barreja de PtdCol, tripalmitin, colesterol i PtEtAmina en  $\text{CDCl}_3$ . També es mostra la superposició de les regions glicerol dels espectres de tripalmitin i dipalmitin (figura 4.26). Com es pot comprovar, els senyals d'aquests dos compostos són separables en les nostres condicions experimentals. El senyal dels  $\text{TAG}_{\alpha'-\gamma'}$  queda separat dels senyals dels DAG. Aquest serà el senyal emprat per les quantificacions posteriors.

#### 4.5.2 Extractes de cèl·lules C6 en condicions estàndard de cultiu

Els extractes de cèl·lules de dia 4 de cultiu ( $n=3$ ) i de cèl·lules de dia 7 de cultiu ( $n=3$ ) van ser estudiats per RMN de correlació  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC. La figura 4.27 mostra un espectre complet d'un extracte de cèl·lules de dia 4. Les assignacions dels espectres dels extractes es troben recollides a la taula 4.12.

El volum dels pics de correlació d'interès va ser integrat utilitzant el programa XWinNMR. Concretament, es van integrar els pics de correlació de l'esquelet hidrocarbonat del glicerol dels TAG, del glicerol dels DAG i del glicerol dels PL. Es va escollir integrar el carboni  $\alpha$  del glicerol, ja que prové del carboni en posició 1 de la glucosa, i aquesta és la posició enriquida en  $^{13}\text{C}$  en la glucosa emprada en els nostres experiments de marcatge (veure figura 4.28). Es va integrar també el pic de correlació del grup colina en fosfatidilcolina. Aquest grup va ser emprat com a estàndard intern. El grup colina no és susceptible de ser marcat, ja que el seu origen en les cèl·lules C6 és extracel·lular i no hi ha síntesi *de novo* (Gillies *et al.*, 1994) Els resultats es mostren a la taula 4.14.

En primer lloc, compararem les dades dels espectres d'extractes d'abundància natural. Si comparem els quocients dels volums dels pics de correlació de  $\text{TAG}_{\alpha'-\gamma'}$  i colina entre extractes de cèl·lules de dia 4 i de dia 7, observem que no hi ha dife-

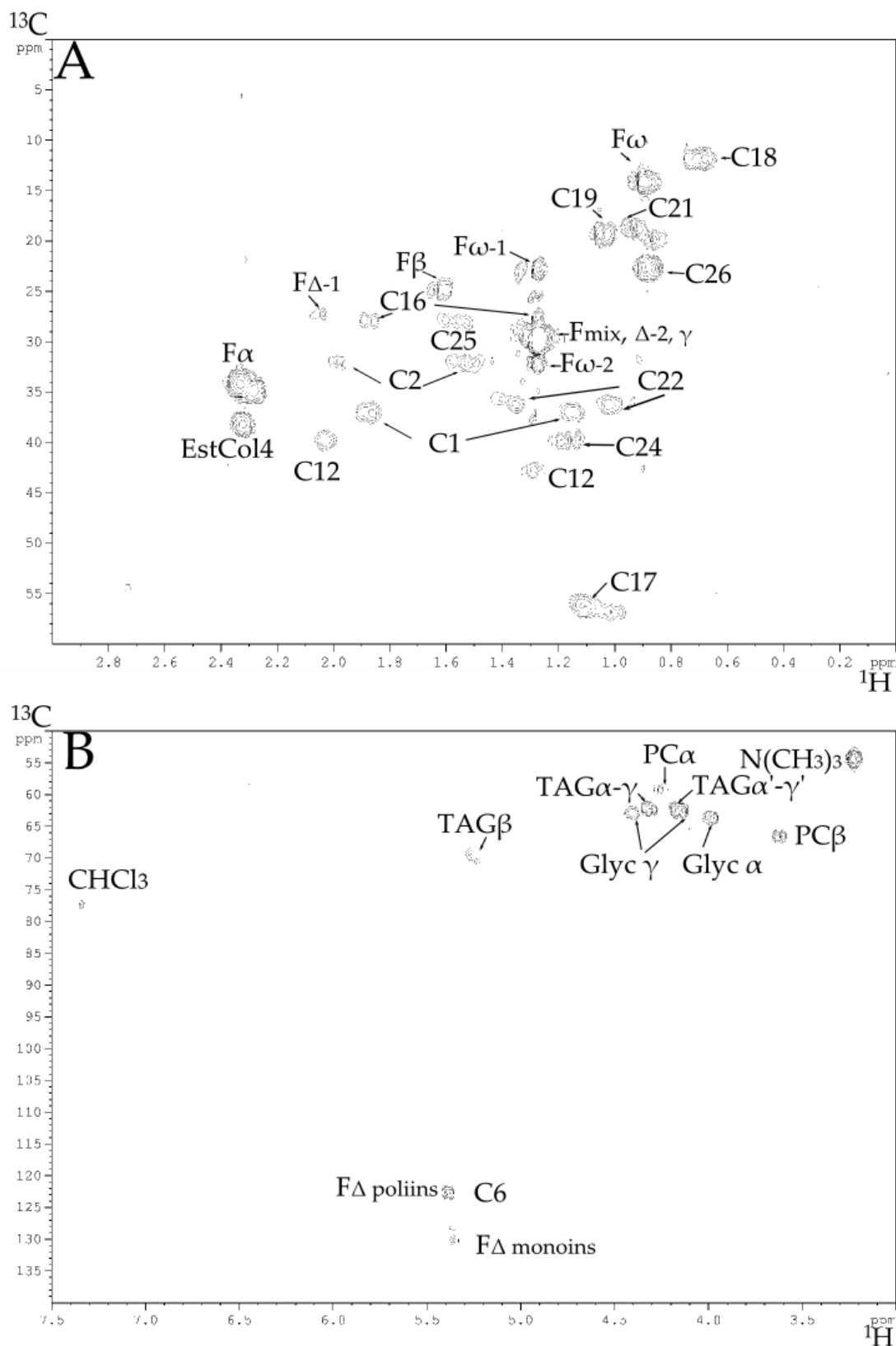


Figura 4.25: Espectre HMQC d'una barreja d'estàndards: tripalmitin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina i colesterol. Per abreviacions, veure la figura 4.19. A- ampliació de la regió 0-3 ppm en  $^1\text{H}$  i 0-60ppm en  $^{13}\text{C}$ ; B- ampliació de la regió 3-8ppm en  $^1\text{H}$  i 50-140ppm en  $^{13}\text{C}$ .

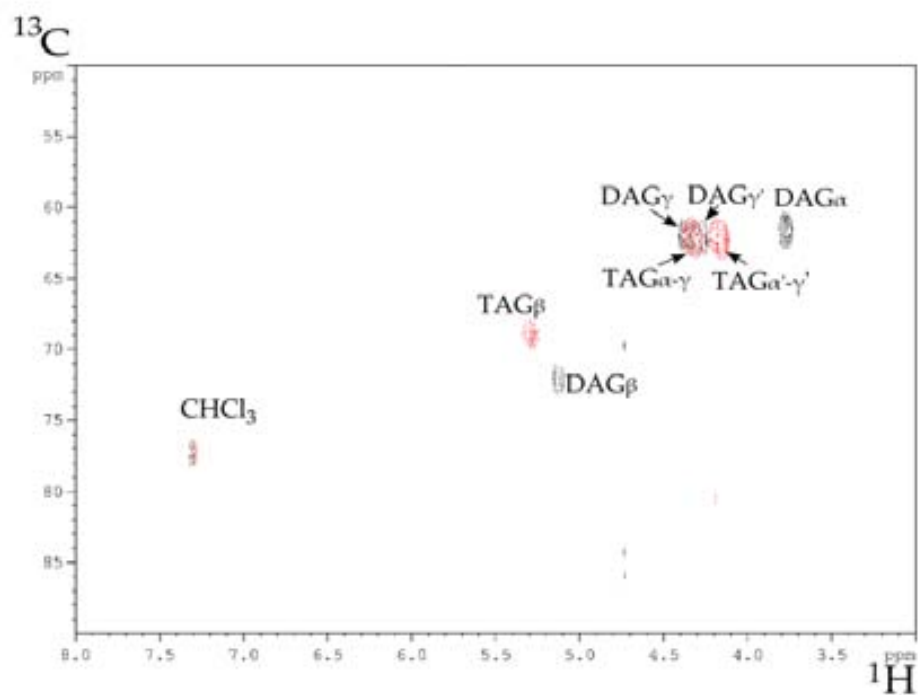


Figura 4.26: Ampliació de la regió dels senyals dels carbonis del glicerol en l'espectre HMQC d'una barreja de tripalmitin i dipalmitin. En vermell: espectre del tripalmitin; en negre, espectre del dipalmitin



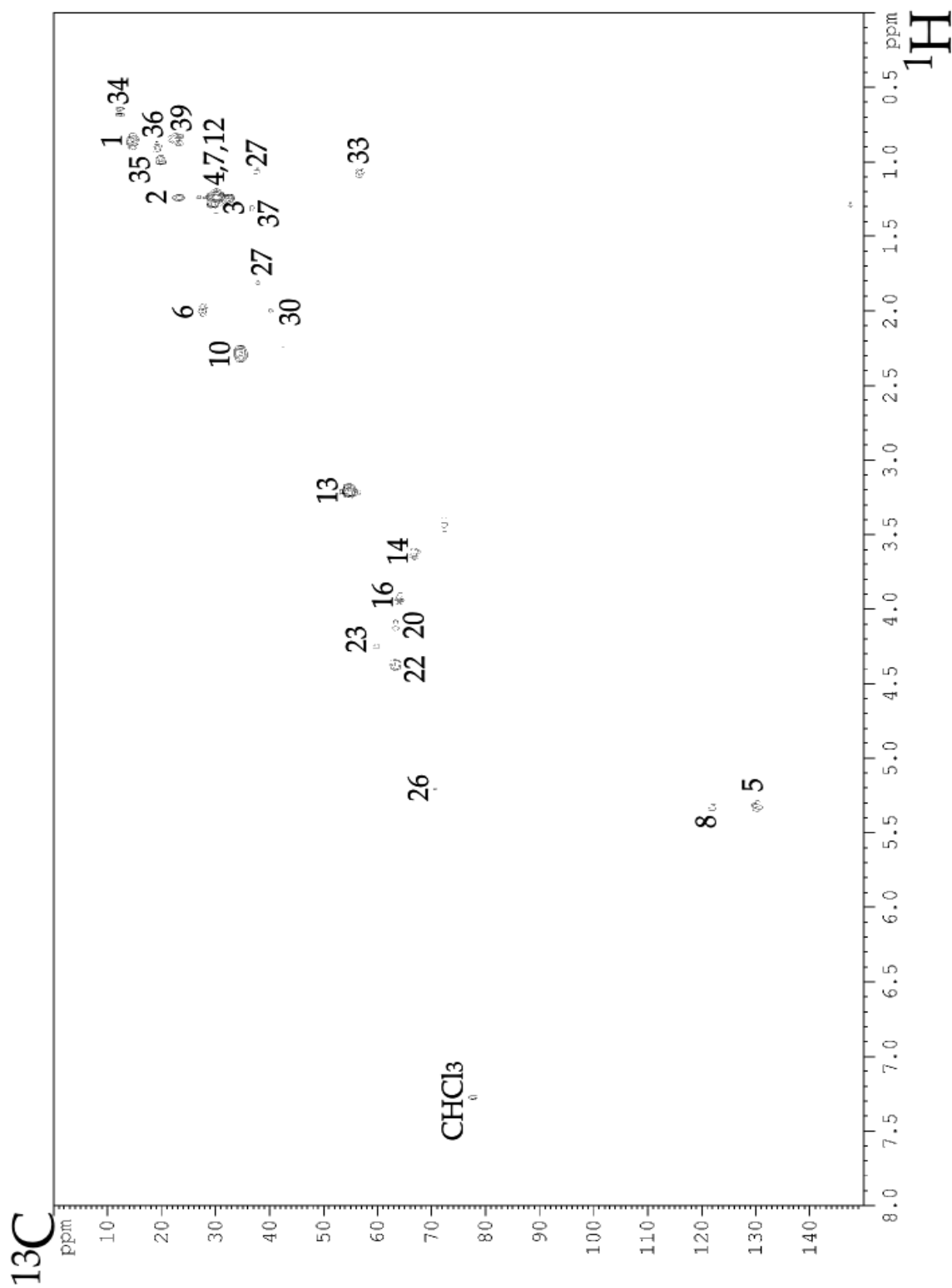


Figura 4.27: Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 4 de cultiu. Per assignacions, veure la taula 4.12

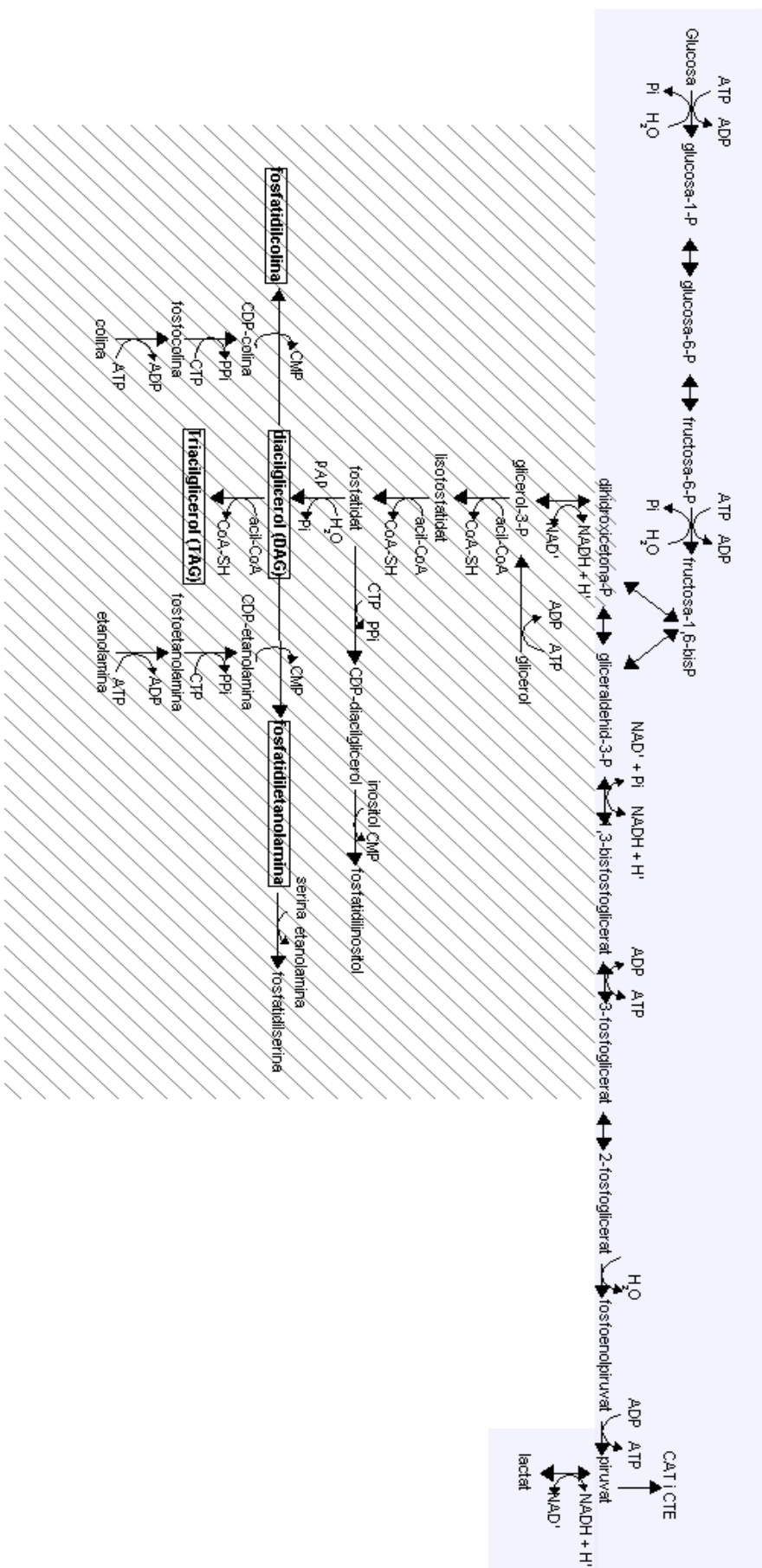


Figura 4.28: Ruta de conversió de glucosa a DAG, TAG i PL segons Mathews (Mathews *et al.*, 2000).

rències estadísticament significatives ( $3,71 \pm 0,27$  vs.  $3,76 \pm 0,33$ , veure taula 4.14). Si considerem que la quantitat de fosfatidilcolina no varia al llarg de la corba de creixement de les cèl·lules C6, aquest resultat indica que no hi ha canvi en el volum del pic de correlació pels TAG, i per tant podem assumir que no hi ha canvi en el contingut de TAG. Aquest resultat es troba d'acord amb les dades de TLC de la quantificació dels extractes de cèl·lules C6 (veure secció 4.7).

En el cas dels PL, prenent el pic de correlació  $Glyc_{\alpha}$  com a pic de referència per aquest compostos, el quocient dels volums dels pics de correlació  $Glyc_{\alpha}$  / colina, no presenta variacions estadísticament significatives en comparar els extractes de cèl·lules de dia 4 amb els de cèl·lules de dia 7 ( $5,08 \times 10^{-2} \pm 7,68 \times 10^{-3}$  vs.  $5,52 \times 10^{-2} \pm 8,80 \times 10^{-3}$ ).

Quan comparem el quocient dels volums de correlació de  $DAG_{\alpha}$  / colina entre extractes de cèl·lules de dia 4 i de dia 7, s'observa un lleuger augment que, tot i ser estadísticament significatiu, es troba en el llindar de la significació ( $p=0,05$ ). Cal destacar que el volum del pic de correlació del  $DAG_{\alpha}$  es troba molt proper al nivell del soroll en el cas d'extractes de cèl·lules de dia 4, com es pot deduir de l'alt valor de la desviació estàndard pel quocient en aquest cas.

Es van integrar també els senyals corresponents als carbonis  $F_{\omega}$ ,  $F_{\alpha}$  i  $F_{\Delta}$  monoin-saturats dels àcids grassos. En aquest cas, s'observa que en els primers dos senyals hi ha una disminució significativa del valor del quocient dels volums dels pics de correlació entre les cèl·lules de dia 4 i les cèl·lules de dia 7, mentre que els monoin-saturats no presenten variacions. Cal tenir en compte que, donat que no es detecten àcids grassos lliures per TLC, aquests senyals correspondran a àcids grassos esterifi-cats. Per altra banda, la disminució en els quocients dels  $F_{\omega}$  i  $F_{\alpha}$  indicaria una certa disminució relativa en el contingut d'aquests compostos entre les dues situacions cel·lulars (0,63 vegades per  $F_{\omega}$  i 0,47 vegades per  $F_{\alpha}$ ).

Finalment, es va escollir integrar el senyal del C26 del colesterol, i es va compro-

var que hi ha una disminució significativa en el valor del quocient per aquest senyal entre dia 4 i dia 7 de cultiu, indicant que hi hauria una disminució del contingut d'aquest compost entre les dues situacions estudiades. En aquesta cas, és possible que estiguem observant tant colesterol com colesterol estrificat.

### 4.5.3 Extractes de cèl·lules C6 incubades amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa

Es van estudiar per RMN de correlació <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HMQC els extractes de cèl·lules de dia 4 incubades durant 24 h (entre dia 3 i 4 de cultiu ) amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa (n=3) i de cèl·lules de dia 7 de cultiu incubades 48 h (entre dia 5 i 7 de cultiu) amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa (n=3). Les figures 4.29 i 4.30 mostren espectres complets d'extractes de cèl·lules de dia 4 i de dia 7 respectivament tractades amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa.

Pels espectres 2D-HMQC es van calcular els quocients dels volums dels pics de correlació respecte del volum del pic de colina, com es descriu a la secció 4.5.2. Els resultats es mostren a la taula 4.14.

Si comparem els quocient de pics de correlació  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$ /colina aquest valor és 2,66 vegades més gran en els extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu que en els extractes de cèl·lules de dia 4 de cultiu. Si comparem el quocient de pics de correlació  $Glyc_{\alpha}$ /colina, en extractes de marcatge de cèl·lules de dia 7 el seu valor és la meitat que en extractes de cèl·lules de dia 4. Si comparem el quocient de pics de correlació  $DAG_{\alpha}$ /colina augmenta 1,88 vegades entre cèl·lules de dia 4 de cultiu i de dia 7 de cultiu. Totes les variacions dels valors dels quocients a dia 4 i dia 7 són estadísticament significatives.

Pel què fa als àcids grassos, els valors dels quocients  $F_{\omega}$ /colina i  $F_{\alpha}$ /colina augmenten significativament entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7, i el quocient  $F_{\Delta}$  monoin-saturats/colina no presenta variacions entre les dues situacions. Finalment, en el cas del colesterol, el quocient C26/colina augmenta de manera significativa de dia 4 a dia 7.

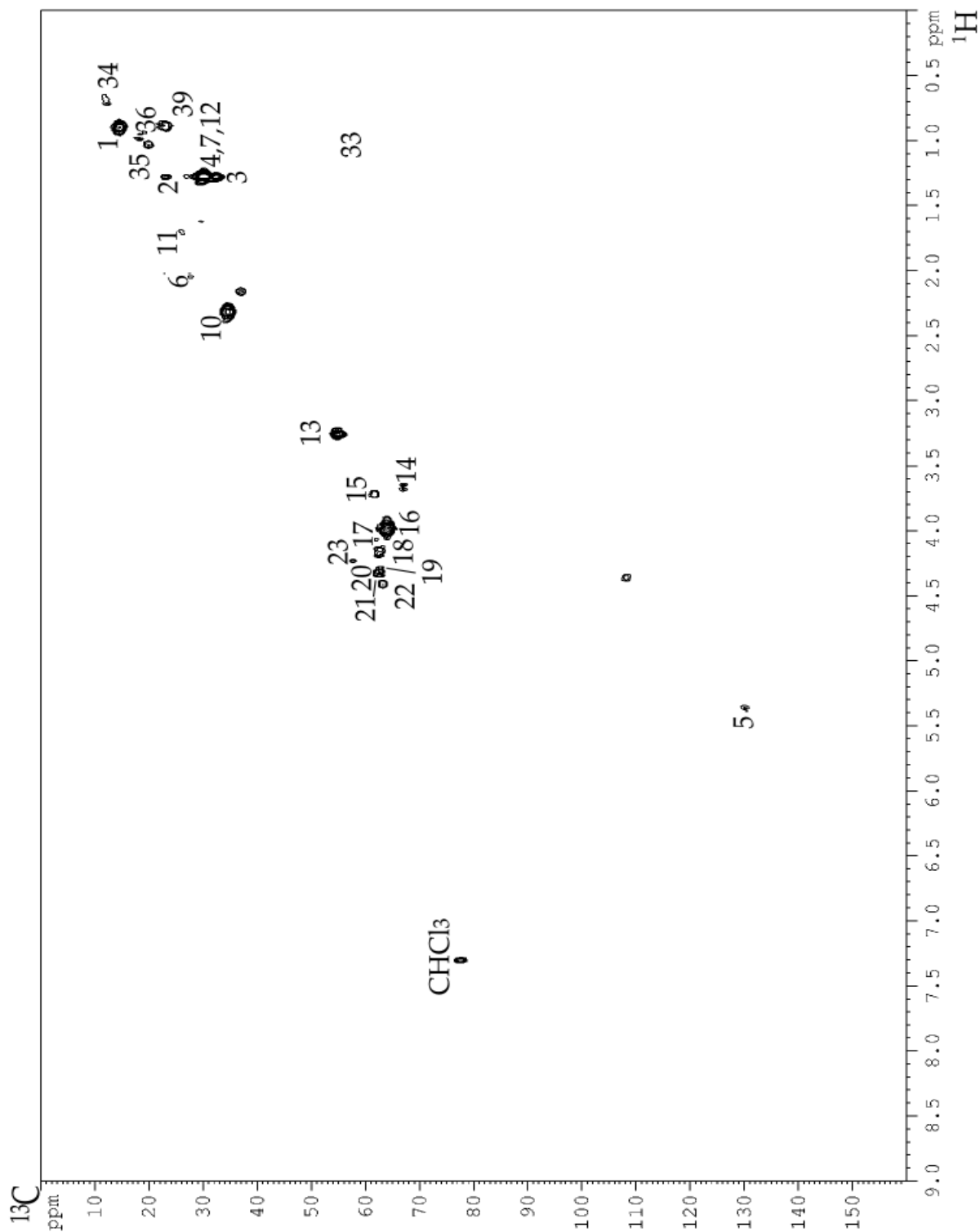


Figura 4.29: Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 4 de cultiu tractades amb  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa

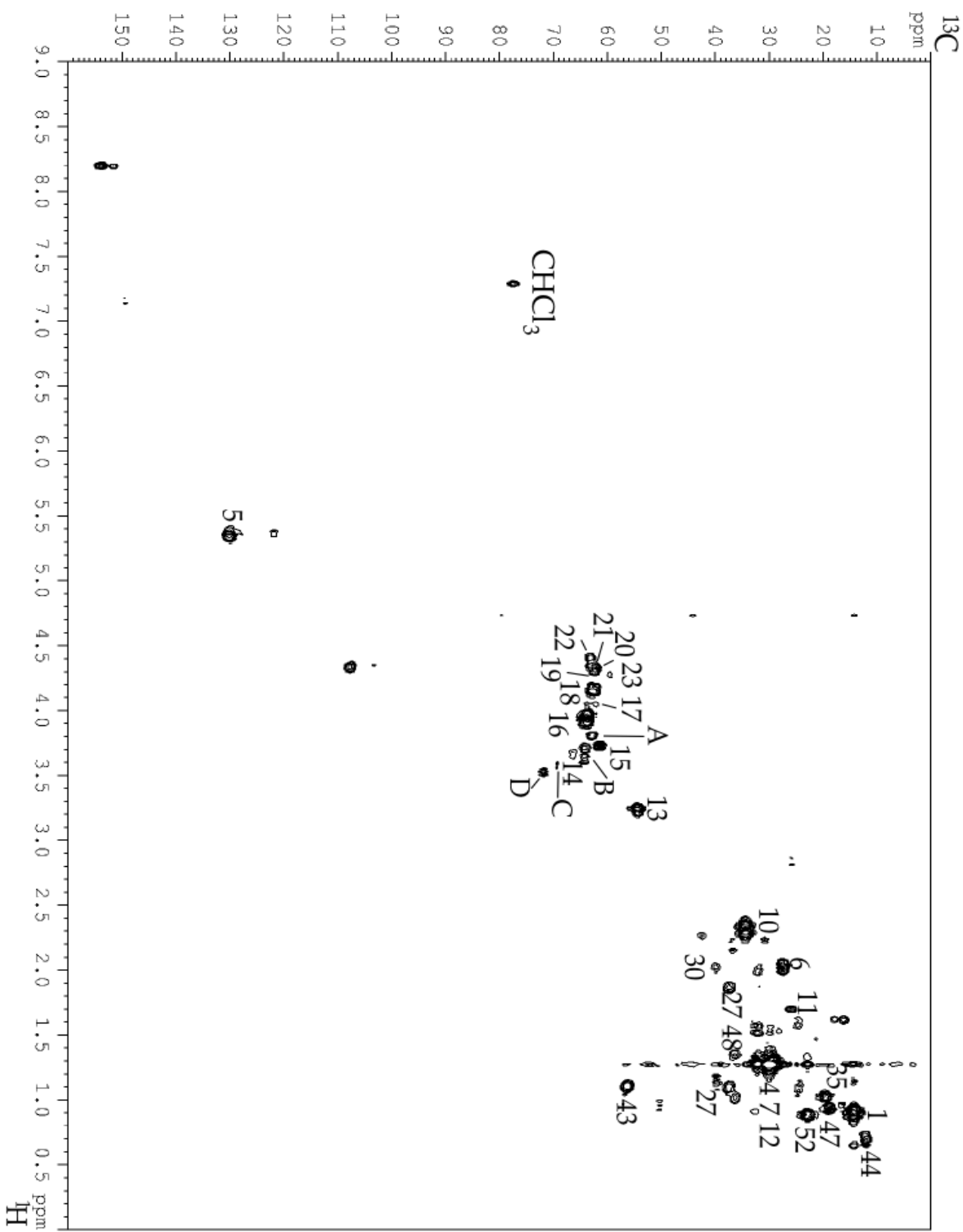


Figura 4.30: Espectre HMQC complet d'un extracte de cèl·lules de dia 7 de cultiu tractades amb  $[1\text{-}^{13}\text{C}\text{-glucosa}$

| extractes de cèl·lules de dia 7     |   |  |  |
|-------------------------------------|---|--|--|
| senyal                              | quocient pels espectres d'abundància natural (n=3) (R1) | quocient pels espectres de marcatge entre dia 5 i dia 7 (48h) (R2) (n=3) | quocient marcatge/abundància natural (R2/R1) |
| $Glyc_{\alpha}$ * $\&$              | $5,08 \times 10^{-2} \pm 7,68 \times 10^{-3}$           | $1,330 \pm 0,151$  | 26   |
| $TAG_{\alpha'-\gamma'}$ * $\&$      | $3,76 \times 10^{-2} \pm 3,28 \times 10^{-3}$           | $0,423 \pm 0,178$  | 11,3   |
| $DAG_{\alpha}$ * $\&$               | $5,03 \times 10^{-3} \pm 2,08 \times 10^{-3}$           | $0,384 \pm 0,249$  | 76,3   |
| $F_{\omega}$ * $\$$                 | $2,049 \pm 0,266$                                       | $14,435 \pm 10,137$  | 7,0  |
| $F_{\alpha}$ * $\$$                 | $0,238 \pm 0,036$                                       | $3,745 \pm 0,923$  | 15,7   |
| C26 $\$$                            | $0,049 \pm 0,018$                                       | $1,029 \pm 0,503$  | 20,8   |
| $F_{\Delta}$<br>monoinsaturats $\$$ | $0,061 \pm 0,026$                                       | $0,593 \pm 0,256$  | 9,7  |
| extractes de cèl·lules de dia 4     |   |  |  |
| senyal                              | abundància natural (n=3)                                | marcatge entre dia 3 i dia 4 (24h) (n=3)                                 | quocient marcatge/abundància natural         |
| $Glyc_{\alpha}$ * $\&$              | $5,52 \times 10^{-2} \pm 8,80 \times 10^{-3}$           | $2,79 \pm 0,275$   | 50,5   |
| $TAG_{\alpha'-\gamma'}$ * $\&$      | $3,71 \times 10^{-2} \pm 2,68 \times 10^{-3}$           | $0,159 \pm 0,072$  | 4,3  |
| $DAG_{\alpha}$ * $\&$               | $2,65 \times 10^{-2} \pm 2,40 \times 10^{-2}$           | $0,204 \pm 0,090$  | 7,7  |
| $F_{\omega}$ * $\&$                 | $3,253 \pm 0,899$                                       | $10,569 \pm 3,758$   | 3,3  |
| $F_{\alpha}$ * $\$$                 | $0,505 \pm 0,267$                                       | $2,891 \pm 0,929$  | 5,7  |
| C26 $\$$                            | $0,203 \pm 0,112$                                       | $0,672 \pm 0,543$  | 3,3  |
| $F_{\Delta}$<br>monoinsaturats $\$$ | $0,056 \pm 0,018$                                       | $0,312 \pm 0,162$  | 5,6  |

Taula 4.14: Valors promig del quocient de la integral dels senyals d'interès respecte del senyals de colina en els espectres HMQC d'extractes. \* indica diferències significatives entre abundància natural i marcatge  $\$$  indica diferències significatives entre dia 4 i dia 7 per les dades d'abundància natural  $\&$  indica diferències significatives entre dia 4 i dia 7 per les dades de marcatge.

#### 4.5.4 Discussió dels resultats dels experiments d'RMN bidimensional

En primer lloc, com es pot comprovar en les dades (taules 4.13 i 4.14), cal fer notar que les variacions d'intensitat en els senyals de  $Glyc_{\alpha}$  i  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  no són les mateixes en els experiments 1D-RMN que en els 2D-RMN. Com s'explica en l'apartat 4.4.3, els experiments 1D-RMN de  $^{13}C$  no són suficientment sensibles per detectar inequívocament les variacions en el marcatge dels diferents carbonis en les nostres mostres. Per altra banda, com s'explica a la secció 3.8.3.2 els experiments de correlació HMQC no són directament quantificables. Per aquest motiu els valors de les variacions dels quocients d'intensitat no són comparables entre els experiments 1D i els 2D, tot i que les conclusions qualitatives que s'extrauen de cada tipus d'experiment si són comparables entre si. De tota manera, per ressonàncies amb bona SNR i ben resoltes, fins i tot en condicions d'abundància natural, com els  $F_{\omega}$ , l'augment relatiu d'intensitat ( 7,7 vegades per 1D-RMN i 7 vegades per 2D-RMN) és força semblant pels dos mètodes.

Els experiments d'1D-RMN de  $^1H$  van mostrar la dificultat de diferenciar els senyals provinents de TAG i PL en la regió del glicerol. Els experiments d'1D-RMN de  $^{13}C$  es podia veure però que l'acumulació de marcatge semblava produir-se de manera més significativa en el carboni  $Glyc_{\alpha}$  dels PL que en TAG. Per tant era imprescindible poder usar una tècnica en que els senyals del glicerol, que són els senyals d'interès, poguessin ser resoltos i quantificats.

Podem comparar, per un mateix dia de cultiu de les cèl·lules, els valors dels quocients dels experiments d'abundància natural i els de marcatge. La figura 4.31 mostra la comparació entre els espectres d'abundància natural i marcatge.

En el cas dels experiments HMQC de correlació  $^1H-^{13}C$  d'extractes de cèl·lules de dia 4 de cultiu, s'observa (taula 4.14) que l'augment en la intensitat del senyal



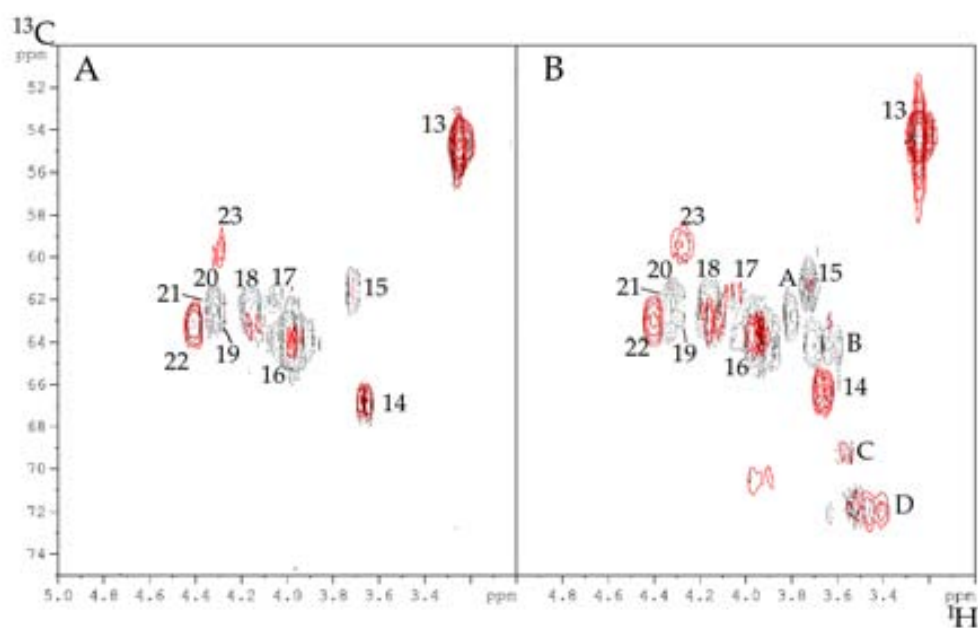


Figura 4.31: Comparació entre els espectres HMQC dels extractes de cèl·lules abundància natural i dels extractes de cèl·lules marcades amb  $^{13}\text{C}$ . A- extractes de cèl·lules de dia 4, B- extractes de cèl·lules de dia 7. En vermell, espectres d'abundància natural; en negre, espectres d'extractes marcats. Per assignacions veure la taula 4.12.

(mesurada com el volum del pic de correlació) de  $Glyc_\alpha$  en marcatge respecte d'abundància natural és de 50,5 vegades, l'augment en el senyal de  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  entre les dues situacions és només de 4,3 vegades, i l'augment en el senyal de  $DAG_\alpha$  és de 7,7 vegades. En aquest cas, el marcatge es va aconseguir incubant les cèl·lules 24 h, entre dia 3 i dia 4 de cultiu (fase exponencial) amb  $[1]-^{13}C$ -glucosa. Durant aquest temps, el nombre de cèl·lules s'ha duplicat (s'ha produït un cicle cel·lular complet), i totes les estructures cel·lulars s'han hagut de duplicar. Per tant, l'augment màxim d'intensitat esperat seria de 25,5%, ja que només la meitat dels glicerols a PL, TAG i DAG sintetitzats *de novo* estarien marcats, suposant que en les cèl·lules inicials un 1.1% de les cèl·lules contenia compostos marcats, degut a l'abundància natural del  $^{13}C$ . Aquesta duplicació cel·lular semblaria poder explicar l'augment en el marcatge dels compostos estudiats, ja que la majoria del glicerol dels compostos estudiats sintetitzats de nou provindrà de la  $[1]-^{13}C$ -glucosa del medi. La diferència entre el màxim teòric d'augment del senyal ( $\approx 25,5\%$ ) i el mesurat pels PL (50,5%) caldria explicar-lo, entre altres possibles raons, per un recanvi intrínsec dels fosfolípids de membrana a part de la seva síntesi neta. Aquest recanvi ha estat demostrat en el cas de la fosfatidilcolina per Jackowski i col·laboradors (Jackowski, 1994; Jackowski, 1996; Jackowski *et al.*, 2000; Jackowski & Fagone, 2005) (veure secció 1.3.2 i figura 1.16). De tota manera, els nostres resultats contradiuen la distribució de marcatge que seria esperable per una ruta de síntesi lineal a un únic compartiment subcel·lular de PL i TAG a partir de glucosa. Els PL, que són productes en aquesta ruta, presenten una incorporació de marcatge més gran que els DAG, que són precursors. La figura 4.32 mostra la distribució de marcatge esperada i obtinguda (veure també la figura 4.28).

Pel què fa als experiments HMQC de correlació  $^1H-^{13}C$  d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu, s'observa que l'augment del quocient entre els experiments d'abundància natural i marcatge pel senyal  $Glyc_\alpha$  és de 26 vegades, l'augment pel senyal

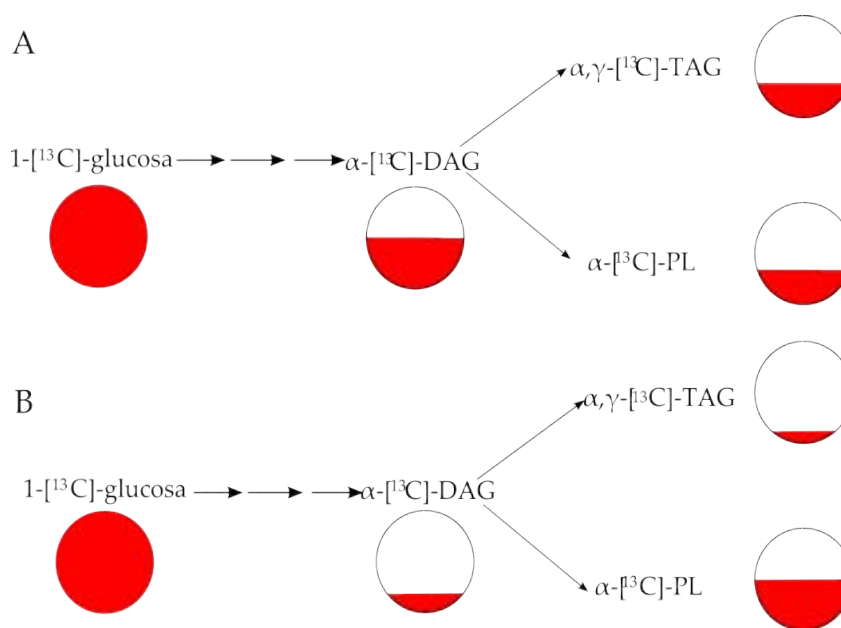


Figura 4.32: Distribució de marcatge en els experiments realitzats. Els cercles indiquen el *pool* del compost, i la zona vermella, el percentatge de compost marcat. A: distribució del marcatge esperada per una ruta de síntesi lineal. Inicialment la glucosa es troba marcada en un 99%, i per tant un màxim del 50% dels DAG es trobaria marcat, i esperariem valors inferiors del percentatge de compost marcat pels productes finals de la via després de la bifurcació en els DAG. B: distribució del marcatge obtinguda en cèl·lules de dia 4. S'observa que només un 7,7% de DAG es troba marcat, un 4,4% dels TAG es troba marcat i un 50% dels PL s'ha marcat.

de  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  és d'11 vegades, i l'augment en el senyal de  $DAG_{\alpha}$  és de 76,5 vegades. És possible que aquest darrer valor, que supera el màxim teòric del 50% pel marcatge dels DAG amb  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa estigui sobreestimat pel valor tan a prop del soroll de fons del senyal dels  $DAG_{\alpha}$  en cèl·lules de dia 7 en absència de marcatge. Com es pot observar, l'augment d'intensitat és més gran en extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu tant per  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  (2 vegades més gran l'augment d'intensitat) com per  $DAG_{\alpha}$  (10 vegades més que en el cas de cèl·lules de dia 4). En canvi, l'augment en el senyal de  $Glyc_{\alpha}$  és pràcticament la meitat en el cas de cèl·lules de dia 7 respecte d'extractes de cèl·lules de dia 4 (1,9 vegades més petit el quocient a dia 7) (veure taula 4.14). En aquest cas, les cèl·lules de dia 7 han passat 48 h incubades en medi amb  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa, i el nombre de cèl·lules s'ha multiplicat per 1,22 (s'han produït 0,4 cicles cel·lulars). La duplicació del material cel·lular només no pot, en aquest cas, explicar l'augment de marcatge, ja que tant  $TAG_{\alpha'-\gamma'}$  com  $DAG_{\alpha}$  presenten un marcatge més alt en 0,4 cicles que en 1 cicle complet, és a dir, el marcatge es més intens a dia 7 que a dia 4. Caldria pensar com en les cèl·lules de dia 4 en l'origen del marcatge dels PL en el recanvi en absència de duplicació neta.

Tal i com ho fèien els experiments d'1D  $^{13}\text{C}$ -RMN (veure secció 4.4.3), **els resultats semblen suggerir que la síntesi dels TAG no es dona directament a partir de la  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa. En aquest cas (dia 7), però, la distribució de marcatge entre els tres compostos si podria ser explicada per una ruta de síntesi lineal**, com es mostra a la figura 4.33

És interessant destacar la presència dels senyals A, B, C i D en els espectres d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu tractades amb  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa. El senyal D apareix també en els espectres d'extractes de cèl·lules de dia 7 de cultiu d'abundància natural (veure figures 4.30 i 4.31). Aquests senyals podrien correspondre a éters de DAG i plasmalògens ((Petresch *et al.*, 1996; Henke *et al.*, 1996; Ferretti *et al.*, 1999). Això podria indicar que aquest compostos són més abundants en cèl·lules C6 de dia

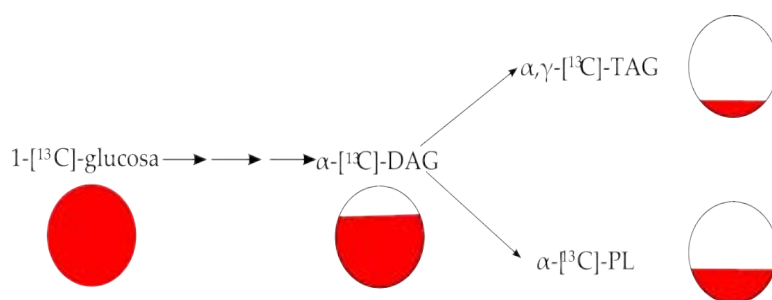


Figura 4.33: Distribució del marcatge obtinguda per cèl·lules de dia 7. Els cercles indiquen el *pool* del compost, i la zona vermella, el percentatge de compost marcat. En aquest cas s'observa un marcatge en DAG del 76,3%, mentre que per TAG és de l'11,3% i pels PL del 26%.

7 de cultiu, i que la seva síntesi es veu accelerada en aquestes condicions.

A la figura 4.28 es mostra la ruta de síntesi de TAG i PL a partir de glucosa. Com es pot comprovar, els DAG es troben a la cruïlla de la síntesi dels dos tipus de lípids, i per tant en són precursors. La distribució del marcatge obtinguda en els nostres resultats fa pensar, però, que segons la situació cel·lular els precursors de la via metabòlica poden variar. En el nostre cas, en les cèl·lules de dia 4 el marcatge s'acumula preferentment en PL, mentre que a dia 7 el marcatge s'acumula preferentment en DAG. Això podria fer pensar en què diferents rutes metabòliques es troben activades. A la figura 4.34 es mostra esquemàticament aquesta idea. En les cèl·lules de dia 4 aparentment la glucosa s'empraria principalment en la síntesi de PL, els quals, actuant com a precursors, donarien lloc als DAG i TAG, que presentarien un marcatge inferior. Per altra banda, en cèl·lules en aturada de proliferació (dia 7), la glucosa aparentment s'empraria per la síntesi de DAG, els quals donarien lloc principalment a PL i minoritàriament a TAG, els quals podrien provenir també de la degradació de PL. De tot manera, la ruta bioquímica principal, indicada a la figura 4.28 correspon a la situació descrita per cèl·lules en aturada de proliferació a la figura 4.34. Caldrà doncs cercar una explicació a la desviació aparent de les rutes de síntesi de PL, DAG i TAG normals en les cèl·lules de dia 4 de cultiu. Aquesta qüestió s'adreçarà a la secció 5.

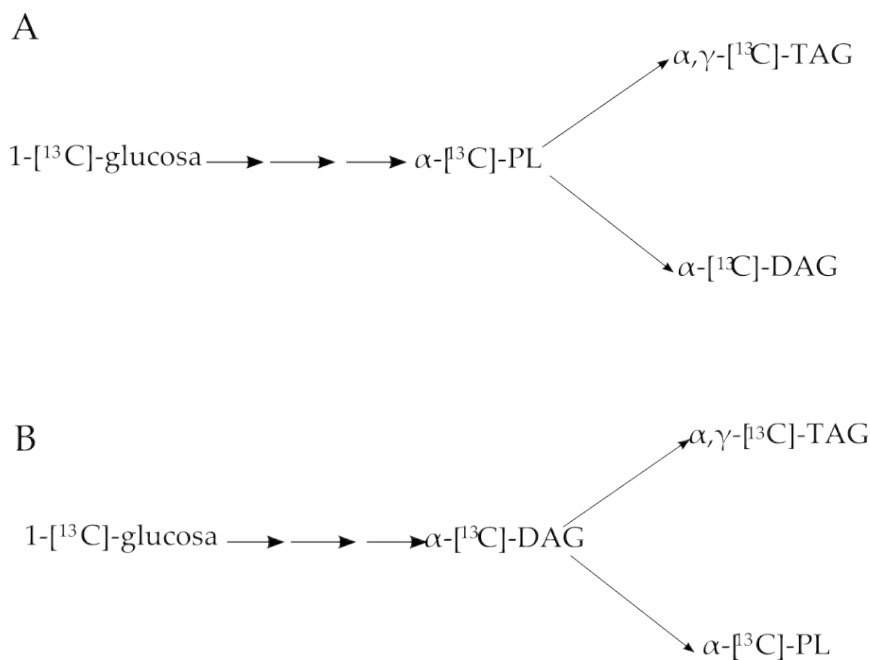


Figura 4.34: Ruta de conversió de glucosa a DAG, TAG i PL segons la distribució del marcatge en els productes. A-ruta en cèl·lules en proliferació activa (dia 4 de cultiu); B-cèl·lules en aturada de la proliferació (dia 7 de cultiu)

Finalment, si comparem els experiments d'abundància natural i marcatge per  $F_{\omega}$ ,  $F_{\alpha}$  i C26, la incorporació de marcatge és més gran en cèl·lules de dia 7 que en cèl·lules de dia 4. Aquests compostos provenen de l'acetil-CoA, que prové de la glucosa però també d'àcids grassos i aminoàcids cetogènics exògens. Aquests resultats semblarien indicar que amb l'aturada de la proliferació a cèl·lules C6 de dia 7, la contribució del *pool* exogen d'origen de l'acetilCoA per la síntesi d'àcids grassos i colesterol disminueix i passa a tenir major importància la contribució de glucosa o altres fonts endògenes marcades. Aquests processos no semblarien estar afectant la síntesi dels  $F_{\delta}$  monoinsaturats.

# Discussió general

## **5.1 Contingut de ML quantificat per espectrosòpia d'RMN i epifluorescència basada en *Nile Red* de cèl·lules C6 intactes**

Els resultats que es presenten a la figura 4.21 i la taula 4.11 demostren un augment en el contingut relatiu de ML respecte de creatina en cèl·lules intactes C6 ATCC amb l'aturada de la proliferació, d'acord amb resultats anteriors obtinguts amb cèl·lules C6 ECACC (Barba *et al.*, 1999). El contingut de creatina s'ha demostrat que és constant per les cèl·lules C6 al llarg de la corba de creixement (Valverde *et al.*, 2006), per tant l'augment de la intensitat dels senyals de ML ha de correspondre a un augment en els ML detectables. L'efecte en el patró de ML provocat per la incubació de les cèl·lules C6 amb ACSF és fins i tot més gran que l'efecte provocat per l'aturada de proliferació en cèl·lules cultivades en medi DMEM, d'acord amb les dades de perfusió anteriors per cèl·lules C6 (Barba *et al.*, 2001), assolint-se un augment màxim de 29,7 vegades en la intensitat de la ressonància dels metilens de les cadenes d'àcid gras quan es comparen cèl·lules de dia 4 de cultiu amb cèl·lules de dia 7 tractades

amb ACSF. Segons això, esperaríem detectar augments comparables en la quantificació de lípids neutres per epifluorescència i TLC .

Els resultats de la taula 4.2 i les figures 4.2 i 4.3 demostren un augment significatiu en el volum total de lípids neutres continguts en gotícules lipídiques citosòliques per tinció amb *Nile Red*. Així, el volum total de gotícules calculat per una cèl·lula promig es multiplica per un factor de 8,8 entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7, mentre que augmenta en un factor de 27,3 si es comparen cèl·lules de dia 4 i dia 7 tractades amb ACSF. Aquest augment seria paral·lel a l'augment en el contingut de ML mesurat a partir de les dades d'RMN, suggerint que les gotícules detectades per epifluorescència expliquen el patró espectral de ML enregistrat per les cèl·lules intactes. Això està d'acord amb treballs previs sobre les cèl·lules C6 en les quals les mesures per RMN de difusió no invasiva van permetre l'assignació del senyal dels ML a un compartiment subcel·lular amb un diàmetre real d'  $1,9 \mu\text{m}$ , compatibles amb el diàmetre de les gotícules lipídiques citosòliques detectades en les mateixes mostres per microscòpia òptica de les cèl·lules tenyides amb *Nile Red* (Pérez *et al.*, 2002). En resum, les mesures d'RMN i epifluorescència en les nostres condicions experimentals semblarien monitorar el mateix *pool* de lípids neutres en les cèl·lules C6.

## **5.2 Contingut de lípids neutres mesurat en extractes lipídics de cèl·lules C6 per cromatografia en capa prima.**

Per altra part, les dades recollides a la taula 4.7 semblen indicar que no hi ha augment en el contingut de cadascun dels lípids neutres estudiats entre les tres situacions estudiades. Això explicaria les dades referenciades a volum cel·lular, ja que si el



### 5.3. COMPARACIÓ DE LES DADES DE QUANTIFICACIÓ PER TLC, RMN I MO151

contingut no varia, es "diluirà" més en les cèl·lules de dia 7 de cultiu, que tenen un volum cel·lular més gran ( $5,66 \pm 3,52$  pl) que les de dia 4 o de dia 7 de cultiu tractades amb ACSF ( $1,95 \pm 1,41$  pl i  $2,22 \pm 1,31$  pl, respectivament).

Si ens fixem en la quantificació d'àcids grassos esterificats en lípids neutres totals, obtinguda a partir de la suma del contingut en àcids grassos de cada lípid neutre (taula 4.7 D), observem que no hi ha variacions entre les tres situacions estudiades. Les variacions estadísticament significatives que s'observen en les dades de  $\mu\text{mols/pl}$  cèl·lula i de  $\mu\text{mols/pl}$  citosol es poden explicar per les variacions de volum cel·lular i citoplasmàtic, ja que com s'ha comentat el volum de les cèl·lules de dia 7 és més gran que el de les cèl·lules de dia 4 i de de dia 7 tractades amb ACSF. Això reforça la idea que el contingut de lípids neutres és essencialment el mateix en les tres situacions cel·lulars estudiades.

### **5.3 Comparació de les dades de quantificació per capa prima de lípids neutres amb les dades d'RMN i microscòpia òptica**

El nostre interès arribat aquest punt és comparar el contingut de lípids neutres en extractes lipídics de cèl·lules C6 amb els resultats obtinguts per microscòpia òptica i per RMN, per determinar si l'augment en el nombre de gotícules lipídiques citosòliques observat per MO i l'augment en el senyal de lípids mòbils observat per RMN correlacionen amb els resultats obtinguts per TLC. Els resultats obtinguts per la quantificació de lípids neutres per TLC es troben recollits a la taula 4.7. Inicialment, si la població de lípids estudiada per les diferents tècniques fos la mateixa, s'esperaria obtenir en aquesta quantificació uns resultats que es correlacionessin amb els obtinguts per les altres tècniques.

Per poder dur a terme aquesta comparació, cal ser molt curosos a l'hora de triar la manera de referenciar els valors del contingut de lípids neutres, ja que en cada cas pot ser necessària una referència diferent. És necessari comparar dades que ens proporcionin el mateix tipus d'informació.

Per realitzar la comparació entre les mesures d'epifluorescència, recollides a la taula 4.2, i les dades de capa prima recollides a la taula 4.7, cal emprar les dades de quantificació per TLC referenciades a  $10^8$  cèl·lules. Per MO observem les gotícules contingudes en cada cèl·lula que són visibles per epifluorescència, i per tant la referència a usar és la cèl·lula, és a dir, el nombre de cèl·lules. El contingut de TAG, DAG, EstCol o àcids grassos totals en lípids neutres no canvia significativament, excepte en el cas dels DAG, el contingut dels quals disminueix entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 de cultiu. Així doncs, podem concloure que el contingut de lípids neutres mesurat per TLC no canvia al llarg de la corba de creixement o amb tractament amb ACSF, i per tant que els canvis detectats per epifluorescència en cèl·lules C6 en cultiu han de ser deguts a canvis en la visibilitat dels lípids neutres, i per tant de les gotícules lipídiques, des del punt de vista de la microscòpia òptica. Aquest canvi de visibilitat podria ser degut a que una part dels lípids neutres continguts en les gotícules no es tenyissin amb el colorant *Nile Red*, provocant una detecció de gotícules que seria inferior al contingut real de lípids neutres.

Respecte d'aquesta possibilitat, Al-Saffar i col·laboradors van demostrar en cèl·lules Jurkat que existeix una correlació entre l'augment del nombre de gotícules citosòliques mesurat per microscòpia confocal i la intensitat de la fluorescència deguda al *Nile Red* mesurada per citometria de flux (Al-Saffar *et al.*, 2002). Això ens permet descartar la possibilitat que alguns lípids continguts en les gotícules del nostre sistema no es tenyeixin. També cal tenir en compte la possibilitat que tot i que els lípids siguin tenyits, les gotícules no siguin detectables en els nostres experiments de microscòpia òptica, probablement degut a que la mida de l'estructura tenyida és

inferior al límit de resolució del microscopi ( $0,111\mu m$  en el nostre cas, veure secció 3.3.2).

Si volem comparar les dades de quantificació de ML per RMN amb les dades de quantificació per TLC, hem de tenir en compte que la mostra estudiada per RMN és un sediment cel·lular. Per tant, la comparació la realitzarem amb les dades referenciades a grams de cèl·lules, obtingudes també a partir d'un sediment de cèl·lules com les dades d'RMN *ex vivo*. Les dades de la taula 4.7 mostren que el contingut de TAG, DAG i EstCol varien lleugerament depenent del punt de la corba de creixement i del tractament fet. Els canvis més extrems que s'observen són un augment significatiu d'un factor de 2 en el contingut de TAG entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 de cultiu i una disminució d'un factor de 0,75 en el contingut de DAG també entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 de cultiu. De tota manera, el contingut en àcids grassos totals no canvia significativament. Per tant, podem concloure que el contingut global de lípids neutres en les cèl·lules C6 mesurat per TLC i referenciat al pes de cèl·lules canvia al llarg de la corba de creixement o degut a tractament amb ACSF, però aquests canvis es produeixen en un rang molt estret (canvis entre 0,75 i 2 vegades) de manera que no reproduïxen els canvis observats en el patró espectral de ML de les cèl·lules C6 en les diferents situacions estudiades, en què la intensitat del senyal dels MLs augmenta fins a 29,7 vegades.

Com es pot comprovar, doncs, els canvis detectats per microscòpia òptica i per RMN en els ML en cèl·lules C6 en cultiu són més grans (es troben en el rang de 3 a 29,7 vegades d'augment) que els canvis en el contingut de lípids neutres quantificat per TLC ( que es troben en el rang de 0,75-2 vegades d'increment). Per tant, els canvis detectats per RMN i MO han de ser deguts a canvis en la visibilitat dels lípids neutres des del punt de vista de la RMN i la microscòpia, i no només a canvis de tipus quantitatiu, deguts a síntesi neta de lípids neutres.

Un paràmetre biofísic que cal tenir en compte per entendre l'aparent invisibilitat

d'una substància per RMN és que el valor de  $T_2$  d'una substància disminueix amb el seu pes molecular aparent, és a dir, quan el temps de correlació o el temps de gir sobre el seu eix augmenta (figura 1.6). Un valor de  $T_2$  curt per la ressonància investigada en aquest compost podria explicar la disminució de la visibilitat d'un compost per espectroscòpia de RMN (Gadian, 1995; Friebolin, 2005). El valor de  $T_2$  per molècules d'alt pes molecular, com proteïnes o sòlids en pols, poden ser suficientment curts com perquè resultin invisibles en RMN d'alta resolució típica.

Les dades sobre lipoproteïnes de mida comparable a les gotícules (LDL o HDL) (Williams *et al.*, 1985; Parks & Hauser, 1996) demostren clarament que aquestes partícules produïxen un patró d'RMN d'alta resolució amb ressonàncies en els desplaçaments químics previstos pels ML (Pérez *et al.*, 2000; Pérez, 2000; Pérez *et al.*, 2002). Llavors, si els lípids neutres que contenen les partícules petites presenten un patró visible de ML, la pregunta és perquè les partícules similars contingudes en les cèl·lules C6 haurien de ser invisibles.

Diverses causes poden restringir el gir de molècules individuals o de partícules, explicant la seva aparent invisibilitat per RMN d'alta resolució. Treballs amb liposomes (Finer *et al.*, 1972a; Finer *et al.*, 1972b; Michaelis & Schlieper, 1982) van demostrar que en els patrons espectrals de liposomes unilamel·lars petits (diàmetre de 23 nm) es detectaven ressonàncies estretes dels fosfolípids (amplada de banda d'alguns hertz) semblants als senyals dels ML, mentre que liposomes multilamel·lars grans (0.2  $\mu\text{m}$  - 4  $\mu\text{m}$  de diàmetre) presentaven ressonàncies molt amples (amplada de banda de l'ordre dels kilohertz). L'efecte de l'estretament de l'amplada de banda va ser atribuït a que es promitjaven els efectes d'eixamplament per acoblament dipolar degut al gir. Per tant, en cas que la mobilitat en les cadenes d'àcids grassos dels lípids neutres dintre d'una partícula (una gotícula, un domini de membrana) fos comparable a la de les cadenes d'àcid gras de fosfolípids en liposomes, la contribució del gir de la partícula a l'amplada de banda de les ressonàncies obtingudes

pels ML seria rellevant per als propòsits del nostre sistema estudiat. Si la possibilitat de gir fos inhibida, la contribució de l'efecte d'estretament de banda també seria eliminada i solament es podria considerar l'efecte de gir o reorientació de la molècula individual. Si el gir d'aquesta molècula individual també fos restringit aquest fet donaria lloc a l'eixamplament de les ressonàncies del ML en els espectres RMN registrats, potser més enllà del límit de detecció.

Així mateix, el patró espectral descrit a la literatura per les vesícules petites que contenen només fosfolípids i no TAG és comparable al patró espectral dels ML en els espectres de les cèl·lules C6 de dia 7 tractades amb ACSF, les quals contenen un alt nombre de gotícules grans plenes de TAG. Les mesures de  $T_2$  dels grups metils i metilens d'àcids grassos de ML en cèl·lules C6 i gotícules lipídiques artificials o liposomes han estat descrits (Pérez *et al.*, 2000; Pérez, 2000). Les gotícules lipídiques artificials petites, liposomes unilamel·lars farcits de TAG, produïxen una ressonància estreta d'alta resolució típica del patró del ML. Aquest valor de  $T_2$  mesurats mostren un comportament biexponencial, i disminueixen amb el diàmetre de la gotícula. Els valors dels components curt/llarg de  $T_2$  per liposomes de 104nm de diàmetre (només una bicapa de fosfolípids sense contingut en TAG) es troben al voltant de 52/261 ms  $T_2$  curt/ $T_2$  llarg, per ML en cèl·lules C6, al voltant de 28/243 ms, i per gotícules artificials grans (micel·les de fosfolípids farcides de TAG, de diàmetre de 2,3 $\mu$ m) al voltant de 129/393 ms. D'això s'extrau que la mida de la partícula influeix de manera significativa en el valor de  $T_2$ , tot i que altres factors, com ara el contingut de les gotícules, poden tenir també un paper important.

Depenent de la grandària de partícula de LDL i de HDL, del tipus de contingut de lípids neutres i de la temperatura de l'enregistrament, els canvis de la fase líquida, a la fase de cristall líquid o a la fase esmèctica dels esters de colesterol poden produir canvis dràstics en l'amplada de banda de la ressonància de la cadena d'àcid gras i de la seva intensitat aparent. S'ha descrit per a les partícules de LDL obtingu-

des de micos *cynomolgus* que els canvis en el gir intrapartícula per la transició de fase líquida a fase de cristall líquid causada pels canvis de temperatura eixamplen ressonàncies de les cadenes d'àcid gras prop de cinc vegades i disminueixen la intensitat aparent fins a tres vegades (Parks & Hauser, 1996). Per tant, fins i tot per a les partícules de lipoproteïna que poden girar lliurement, la mobilitat interna restringida pot reduir la visibilitat de les cadenes d'àcid gras. Referent a això, la discrepància esmentada en els resultats (secció 4.3.4) i també descrita per Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) sobre canvis possibles en el grau d'insaturació dels ML al llarg de la corba de creixement, es podria relacionar amb els canvis en la restricció de la mobilitat de les cadenes d'àcid gras quan les gotícules es fusionen (veure la secció 5.5).

Pel nostre sistema, si les gotícules es trobessin unides a estructures macromoleculares dins la cèl·lula, per exemple el citoesquelet, aquestes gotícules no gaudirien de la llibertat de gir de la que gaudeixen les partícules lliures, com les lipoproteïnes, i el valor de  $T_2$  de les ressonàncies dels TAG en aquest cas no es veuria allargat degut a aquesta manca de llibertat. En aquest cas, només la difusió tridimensional dins de la gotícula de TAG, EstCol i DAG, o la difusió bidimensional dels DAG al llarg de la superfície de la gotícula, podrien contribuir a augmentar el valor de  $T_2$ . Probablement, perquè la difusió intragotícula tingui un efecte apreciable sobre el  $T_2$  observat sigui necessari un diàmetre mínim de la gotícula. Aquest valor podria ser proper al valor del diàmetre de les gotícules observades per epifluorescència com entitats diferenciades del fons, que tenen aproximadament 100 nm de diàmetre. Això significaria que quan es duu a terme una fixació, un subfraccionament cel·lular o un tractament amb detergent de cèl·lules per estudiar els ML en cèl·lules (Ferretti *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2003), seria necessari tenir en compte, per una correcta interpretació dels resultats, que aquests tractaments poden interferir en la unió de les gotícules al citoesquelet, resultant en un augment artefactual dels ML detectables

per RMN *in vitro* en comparació amb els ML detectables en cèl·lules intactes.

Per tant, sembla que la aparent invisibilitat de les gotícules per RMN podria concordar amb una manca de detecció d'aquestes estructures subcel·lulars per MO. És a dir, les gotícules visibles per MO (al voltant de 100 nm de diàmetre promig mínim) serien també visibles per RMN, i contribuirien al senyal dels ML. Seria possible també l'existència de diversos tipus de gotícules de mida prou gran com per ser visibles per MO, però que al estar unides a estructures macromoleculares no serien detectables per RMN.

En resum, els nostres resultats del TLC convindrien que existeix un *pool* de lípids neutres invisibles per RMN i epifluorescència situats en les estructures o els dominis subcel·lulars més petits de 100 nm en les cèl·lules C6. Les raons d'aquesta invisibilitat poden venir de restriccions en el gir de partícules o dominis subcel·lulars, i per la restricció en el gir de molècules individuals contingudes en aquestes partícules o dominis subcel·lulars. Ambdós mecanismes poden contribuir a aquest efecte final de no detecció registrat en les cèl·lules C6 .

## 5.4 Experiments d' RMN d'extractes de mostres marcadades amb [1]-<sup>13</sup>C-glucosa

Com es comentava a la discussió prèvia de l'anàlisi dels espectres d'1D-<sup>13</sup>C-RMN i dels experiments d'RMN bidimensional (seccions 4.4.3 i 4.5.4) en els experiments d'RMN de mostres tractades amb <sup>13</sup>C s'observa la tendència a l'acumulació de marcatge en el carboni  $\alpha$  del glicerol dels PL. A la figura 4.28 s'indiquen els passos metabòlics que porten de glucosa als diferents glicerolípid. Com s'indicava a la figura 4.34, en cèl·lules de dia 4 de cultiu es podia pensar que la ruta metabòlica de síntesi de glicerolípid estava modificada, i que els PL eren precursors de DAG i TAG. La major acumulació de marcatge en PL que en DAG i TAG en aquestes condicions es

pot explicar per la participació de precursors no marcats en la síntesi de TAG i DAG. A la figura 5.1 es mostren rutes alternatives a la ruta clàssica mostrada a la figura 4.28 per la síntesi de PL i TAG a partir de DAG.

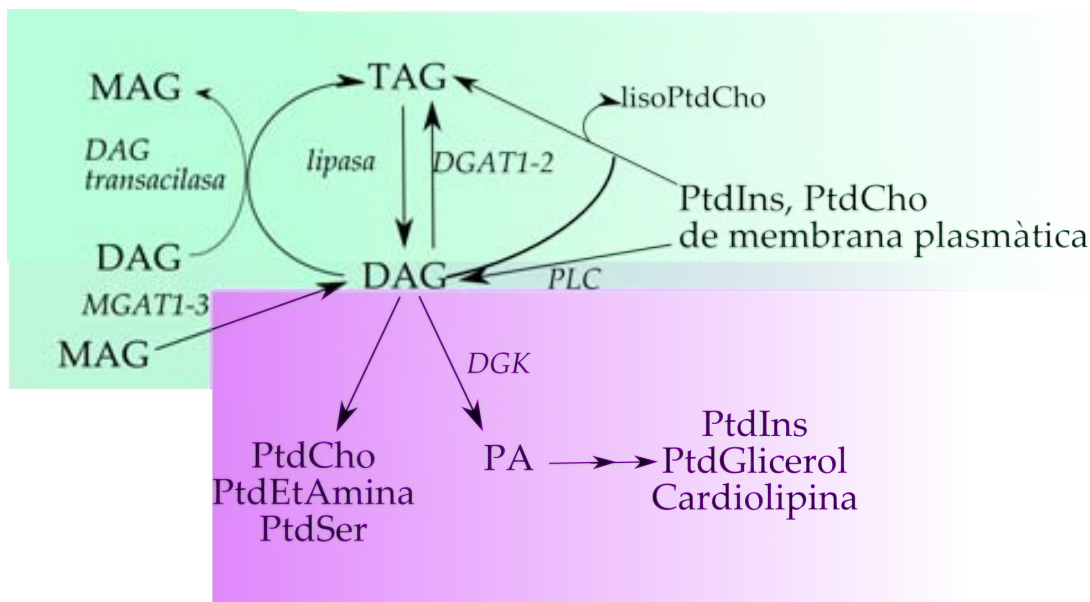


Figura 5.1: Rutes de síntesi de TAG, DAG i PL a partir de precursors "freds". En blau es marquen els processos de síntesi de TAG, i els processos de síntesi de PL s'indiquen en lila.

Així, en cèl·lules de dia 4, en proliferació activa, s'observa que la incorporació de marcatge és més alta en PL, que són producte en la ruta, que en DAG, que són precursors en aquesta ruta. Aquest resultat només es poden explicar tenint en compte que s'està donant la ruta metabòlica de manera compartimentalitzada. Aquesta situació ha estat descrita anteriorment, entre d'altres per Cruz i Cerdán (Cruz & Cerdán, 1999) pel cas de l'existència de dos *pools* de glutamat en el cervell humà. En el nostre cas, això significaria que cal tenir en compte dos *pools* de DAG, de manera que existís un *pool* marcat, procedent de la glucosa, i un de no marcat, amb un altre origen metabòlic. La suma dels dos *pools* produiria l'efecte de dilució del marcatge en els DAG. Les rutes de síntesi de DAG i TAG a partir de fonts no marcades serien més actives en cèl·lules en proliferació (dia 4 de cultiu) que en aturada de la proliferació (dia 7 de cultiu), essent els PL de membrana degradats la font de glicerol no marcat



més important. D'aquesta manera, el contingut en DAG i TAG no marcats seria alt i aquestes concentracions de compostos no marcats diluirien el marcatge total de DAG i TAG, fent que resultés menor el seu enriquiment en els estudis amb  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa. En el cas de cèl·lules de dia 4, les rutes de síntesi de PL seran molt actives, ja que la cèl·lula es troba en proliferació ràpida (fase exponencial).

En canvi, en cèl·lules de dia 7, en aturada de proliferació, les rutes de síntesi de DAG i TAG a partir de presursors no marcats serien menys actives, fent que els TAG i DAG que se sintetitzin resultin més marcats, per derivar el seu esquelet glicerol més directament de la glucosa marcada. Així mateix la síntesi de PL estarà alentida o aturada, de manera que el contingut de PL sintetitzats *de novo* serà més baix, i per tant la incorporació relativa de marcatge serà també més baixa. En el cas de cèl·lules de dia 7, la distribució del marcatge en la ruta de síntesi de TAG i PL a partir de glucosa és l'esperable si tenim només en compte una ruta lineal de síntesi. En aquest cas, doncs, no és necessari tenir en compte una possible compartimentalització per explicar els resultats obtinguts.

## 5.5 Possible explicació cel·lular dels resultats obtinguts: la hipòtesi de la llançadora de TAG

Per poder comparar les nostres dades amb dades anteriors descrites a la literatura i poder aconseguir una explicació cel·lular pels canvis biofísics en la detecció dels lípids mòbils visibles per RMN, sembla bona idea representar la nostra proposta amb un esquema. L'esquema de la figura 5.2 està basat en esquemes anteriors que descriuen el metabolisme de TAG i PL en les cèl·lules (Murphy & Vance, 1999; Hakumaki & Kauppinen, 2000; Coleman & Lee, 2004) i ha estat recentment descrit a la literatura (Quintero *et al.*, 2007).

El fet que la síntesi de TAG i PL es dona bàsicament en reticle endoplàsmic (RE),

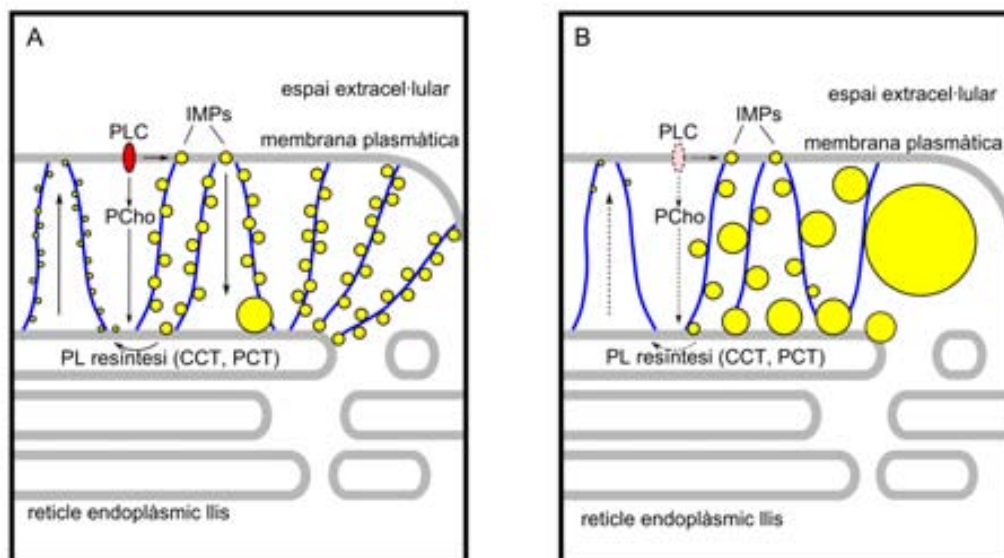


Figura 5.2: Esquema de la dinàmica de les gotícules lipídiques citosòliques que contenen TAG en cèl·lules C6: A- proliferant activament i B- en aturada de la proliferació. IMPs: *intramembrane particles* partícules intramembrana; PL: fosfolípids; CCT: CTP-fosfocolina citidilil transferasa; PCT: fosfocolina transferasa.

amb una petita contribució dels mitocondris, està plenament acceptada (Coleman & Lee, 2004; Dennis & Kennedy, 1972). A més, pel que fa a la degradació de PL a la membrana plasmàtica, especialment la degradació de PtdCho, s'accepta que es dona de manera discontinua al llarg del cicle cel·lular (Jackowski, 1994), tal i com es mostra a la figura 1.16. La degradació de PtdCho és elevada durant la fase  $G_1$  i s'atura durant la fase S/ $G_2$ -M, mentre que la seva síntesi a nivell de RE es manté elevada durant la fase S, donant com a resultat un augment net en el contingut de PtdCho en la fase S, que resulta necessari per la duplicació cel·lular. La fosfocolina i colina, generades a nivell de membrana plasmàtica per la degradació de PtdCho per fosfolipases del tipus C i D respectivament, poden difondre lliurement cap al RE travessant el citosol, per permetre la resíntesi de PtdCho a RE per l'enzim CTP:fosfocolina citidililtransferasa (CCT) (Jackowski & Fagone, 2005). Els DAG o àcids grassos generats a la membrana per la degradació de PtdCho no poden difondre pel citosol per retornar al reticle, i han de ser consumits en el lloc de producció (és a dir, a la membrana) o bé ser transportats fins el lloc on es puguin consumir. El consum de

DAG a la membrana no s'havia descrit, a més només s'havia detectat activitat CCT a nivell de RE, tot i que si ha estat detectada síntesi de PtdCho a partir de DAG i esfingomielina en cèl·lules epitelials MDCK per acció reversa de l'esfingomielina sintasa (van Helvoort *et al.*, 1994). Per tant, sembla necessari un transport de DAG de la membrana plasmàtica al RE, per poder reutilitzar l'esquelet hidrocarbonat de la PtdCho de membrana plasmàtica.

La utilització del DAG generats a membrana ha estat estudiada prèviament. Treballs de Pagano i Longmuir (Pagano & Longmuir, 1985) van mostrar un moviment facilitat d'un anàleg fluorescent de DAG de la membrana plasmàtica a altres membranes cel·lulars (RE, mitocondri, embolcall nuclear) a baixes temperatures (2 °C). El mecanisme de transferència facilitada no va ser aclarit, però entre les possibilitats comentades, es proposava la difusió lateral de l'anàleg de DAG marcat amb fluorescència entre posicions properes i punts de contacte entre la membrana plasmàtica i altres membranes cel·lulars. Aquest contacte entre membranes s'ha demostrat en llevats (Pichler *et al.*, 2001) i en macròfags fagocítics (Gagnon *et al.*, 2002).

Una altra possibilitat a tenir en compte és que els DAG generats a la membrana plasmàtica siguin consumits *in situ*. Florin-Christensen i col·laboradors (Florin-Christensen *et al.*, 1993) van demostrar que la incubació de cèl·lules NIH 3T3 amb dioctanoilglicerol marcat amb <sup>14</sup>C donava lloc a dioctanoilfosfatidilcolina i dioctanoildiàcilglicerol, essent el TAG més abundant que el fosfolípid. El mateix grup (Florin-Christensen *et al.*, 1992) va demostrar que el tractament de les cèl·lules NIH 3T3 amb dioleoil-sn-glicerol marcat amb <sup>14</sup>C i incorporat a la membrana cel·lular per mitjà de liposomes donava lloc també principalment a TAG marcats, fosfocolina i, en menor mesura, monoàcilglicerol i àcids grassos. En cèl·lules CHO s'ha demostrat que els DAG generats a nivell de membrana plasmàtica són directament convertits a TAG (Igal *et al.*, 2001). Això planteja la possibilitat que els DAG siguin convertits a TAG a nivell de membrana, i després DAG i TAG siguin transportats

mitjançant vesícules fins a RE o altres membranes cel·lulars. Respecte a aquesta possibilitat, les activitats relacionades a síntesi de TAG a partir de DAG ( diacilglicerol O-aciltransferasa, DGAT i DAG transacilasa, veure figura 1.19 (Coleman & Lee, 2004)) semblen estar associades únicament a RE, i no s'havia trobat encara cap evidència d'isoformes associades a membrana plasmàtica, tot i que l'enzim unit a membrana ha estat parcialment purificat de microsomes de fetge de rata (Polokoff & Bell, 1980). Cases i col·laboradors (Cases *et al.*, 1998; Cases *et al.*, 2001) van expressar el cDNA que codificava per la DGAT2 en cèl·lules d'insecte, i van comprovar que s'estimulava la síntesi de TAG en les membranes cel·lulars, però sense diferenciar membrana plasmàtica de la resta de membranes.

Les gotícules lipídiques citosòliques, (o cossos lipídics) han estat àmpliament descrits en cèl·lules de mamífers (Zweytick *et al.*, 2000). Tenen mides molt diverses (entre 0,1 i 50  $\mu\text{m}$ ) i porten associades diferents proteïnes (*adipose-differentiation-related-protein*, proteïna associada a la diferenciació d'adipòcits, o ADRP; perilipina, entre d'altres). Entre les proteïnes associades a gotícules lipídiques, ha estat descrita l'existència d'una acil-CoA transferasa en adipòcits 3T3-L1 per Brasaemle i col·laboradors (Brasaemle *et al.*, 2004) i en cèl·lules d'hepatoma humà per Fujimoto i col·laboradors (Fujimoto *et al.*, 2004). La isoforma de la DGAT2 ha estat descrita associada també a gotícules en llevats per Sorger i col·laboradors (Sorger & Däum, 2003), el fong *M. ramanniana* per Kamisaka i col·laboradors (Kamisaka *et al.*, 1997; Kamisaka *et al.*, 1999) i en cossos lipídics en plantes per Valencia-Turcotte i col·laboradors (Valencia-Turcotte & Rodríguez-Sotres, 2001). Aquestes dues activitats juntes, acil-CoA transferasa i DGAT2, permetrien la síntesi de TAG a partir de DAG i àcids grassos lliures associats a gotícules lipídiques. També Öst i col·laboradors (Öst *et al.*, 2005) han demostrat recentment la síntesi de TAG a partir d'àcid olèic exogen en una nova subclasse de caveoles en la membrana plasmàtica d'adipòcits de rata i van concloure que tots els enzims necessaris per la síntesi de

*novu* de TAG haurien d'existir en les caveoles de la membrana plasmàtica. Això permetria explicar la síntesi dels TAG i la seva incorporació a les gotícules: la DGAT2 unida a gotícules, i possiblement a membrana plasmàtica, sintetitzaria TAG a partir dels DAG generats a membrana per la degradació de PL per la fosfolipasa C, i els inclouria en les gotícules, les quals circularien fins a RE per reutilitzar els TAG per la síntesi de nous PL. Està acceptat ampliament que un cop els DAG s'han convertit a TAG, aquests són empaquetats en forma de gotícules lipídiques, per tant aquesta possibilitat sembla la més plausible.

Recentment Boström i col·laboradors han demostrat en cèl·lules NIH 3T3 (Boström *et al.*, 2005) que gotícules lipídiques de mida petita poden augmentar de mida per fusió entre elles i que aquesta fusió és dependent de transport actiu associat a microtúbuls. Marcinkiewicz i col·laboradors (Marcinkiewicz *et al.*, 2006) han demostrat que el procés contrari també es dona, és a dir, que la fosforilació de la proteïna perilipina en preadipòcits 3T3-L1 causa la fragmentació i dispersió de les gotícules lipídiques. Targett-Adams i col·laboradors (Targett-Adams *et al.*, 2003) han demostrat transport actiu de gotícules lipídiques, a una velocitat de 2-2,5  $\mu\text{m}/\text{s}$ , associat a una xarxa de transport cel·lular en cèl·lules HuH-7 derivades d'hepatoma humà. Aquestes troballes en conjunt semblen indicar l'existència d'un transport actiu de gotícules que contenen TAG en cèl·lules vives que estaria associat al citoesquelet (en el cas de les HuH-7, a microtúbuls) i que les gotícules poden fusionar-se entre elles per canviar de mida. Aquesta idea forma part de la nostra hipòtesi, mostrada a la figura 5.2.

Per una part (figura 5.2 A) en cèl·lules C6 en proliferació activa, les gotícules petites (de menys de 100 nm de diàmetre) que es trobaven associades a citoesquelet transportarien l'esquelet carbonat (TAG obtinguts de DAG originats en la degradació de PL de membrana plasmàtica) per la resíntesi de PL de la membrana plasmàtica al RE, o bé l'emmagatzemarien mentre aquest aport no fos necessari. Pel que fa a

la visibilitat de les gotícules per RMN, els TAG continguts en aquestes gotícules, associades a citoesquelet, no tindrien prou mobilitat com per tenir un  $T_2$  prou llarg que les fes visibles per aquesta tècnica, fins i tot a temps d'eco zero. Moltes d'aquestes gotícules serien també massa petites per ser visibles per epifluorescència. Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) varen demostrar l'existència de partícules intramembrana que contien lípids (*intramembrane particles*, IMPs) en la membrana de cèl·lules 3T3, que eren diferents de caveoles, i amb un diàmetre promig de 60 nm. Es va proposar que aquestes estructures intramembrana contribuïen al patró de RMN dels ML, però degut a la coexistència de les IMPs amb gotícules lipídiques citosòliques grans (entre 0,2 i 1  $\mu m$ ), la seva contribució quantitativa no es va poder provar de manera definitiva. Aquests IMPs podrien ser dominis que continguessin DAG/TAG, i correspondrien al dominis de membrana que es mostren a la figura 5.2 i que van ser inicialment proposat per Mountford i col·laboradors (Mountford *et al.*, 1982). A diferència d'aquest i altres grups (Ferretti *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2003) nosaltres proposem que aquests IMPs tindrien molt poca o cap visibilitat per RMN degut a la seva integració en la membrana cel·lular.

Per altra banda (figura 5.2 B) en aturada de la proliferació, si la síntesi de PL s'atura, les gotícules petites que estarien transportant o emmagatzemant TAG entre la membrana plasmàtica i el RE, podrien acumular-se i fusionar-se. La seva acumulació podria ser deguda a una aturada del consum de DAG, i per tant de TAG, ja que la CCT està inibida en condicions d'aturada de la proliferació (Jackowski & Fagone, 2005). Quan la mida de les gotícules superès un determinat rang (100-200  $\mu m$ ), passarien a ser visibles tant per RMN com per microscòpia. En la bibliografia es descriu un resultat similar amb una aproximació diferent. Així, Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) varen augmentar artificialment la degradació de PtdCho a la membrana de cèl·lules NIH 3T3 transfectades amb l'oncogen *ras* afegint de manera exògena fosfolipasa C. En aquest treball, l'augment en el contingut de DAG produït

per l'enzim contribuïa parcialment a la producció de gotícules lipídiques citosòliques que s'acumulaven i esdevenien visibles per RMN. Els autors suggerien que els DAG eren convertits a TAG i AGL. L'acumulació de gotícules lipídiques citosòliques es podria explicar probablement perquè al RE no es podia consumir l'excès de DAG produïts per unitat de temps.

Pel què fa als nostres resultats de marcatge amb  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa, creiem que corroboren la hipòtesi formulada. La figura 5.3 mostra les situacions cel·lulars des del punt de vista dels experiments de marcatge. En cèl·lules de dia 4 de cultiu (figura 5.3A), les dades obtingudes mostren la necessitat de l'existència de com a mínim dos compartiments diferents de síntesi de DAG. En aquest cas, la glucosa genera DAG a nivell de RE, els DAG generen PL que són transportats a la membrana plasmàtica, i també TAG, que poden ser utilitzats per la cèl·lula. Els PL de membrana, al seu torn, són degradats per la fosfolipasa C, generant DAG, que es convertiran en TAG i seran empaquetats en gotícules per ser reenviats al RE. La suma dels diferents *pools* (marcats i no marcats) de tots els compostos estudiats permet explicar els resultats de marcatge obtinguts experimentalment.

Si tenim en compte aquesta compartimentació de processos de síntesi i degradació de PL, TAG i DAG, els DAG provinents de la degradació de membrana plasmàtica diluirien el *pool* de DAG marcats que provenen de  $[1]-^{13}\text{C}$ -glucosa i que s'haurien sintetitzat al RE segons les reaccions esquematitzades a la figura 4.28. Els DAG marcats s'emprarien principalment per la síntesi al RE de PL en les cèl·lules C6 en proliferació activa (dia 4 de cultiu), donant lloc a una gran quantitat de marcatge específic en PL. Cal recordar que la majoria de les cèl·lules en proliferació passen per la fase S del cicle cel·lular, en el qual la síntesi de PtdCho a RE és més elevada, durant les 24 hores en què es va fer el marcatge de les cèl·lules C6 a dia 4 (les cèl·lules C6 tenen un temps de duplicació de 18 h). Per tant, només una petita part dels DAG marcats s'emprarien per sintetitzar TAG marcats a RE, i la gran majoria

de TAG seran no marcats perquè provindran de DAG produïts a la membrana d'un *pool* de PL majoritàriament fred. Una petita part de PL marcats pot donar lloc a DAG que generin TAG marcats i que s'unirien als TAG sintetitzats al RE.

Per altra banda, en cèl·lules de dia 7 (figura 5.3B), una ruta lineal de síntesi des de la glucosa als PL i TAG permet explicar els nostres resultats. En aquest cas, els DAG marcats donaran lloc al RE a TAG i PL marcats, però aquests darrers a menor velocitat que en cèl·lules de dia 4 ja que la síntesi de PL es trobarà disminuïda inicialment o aturada finalment. D'aquesta manera es produirà una acumulació de DAG marcats no utilitzats. Al seu torn, l'activitat fosfolipasa C queda inhibida per l'aturada de proliferació, de manera que es deixen de degradar PL de membrana, i per tant també s'atura la producció de DAG i de TAG a la membrana plasmàtica i/o gotícules lipídiques, impeding per tant la dilució del marcatge a DAG i TAG. Les gotícules citosòliques petites a més es fusionen per donar lloc a les gotícules més grans detectables per epifluorescència i RMN.

És important destacar que, tenint en compte que els resultats obtinguts per TLC indiquen que el contingut de TAG no canvia entre cèl·lules en proliferació activa i cèl·lules en aturada de la proliferació, les velocitats de síntesi i degradació de TAG han de ser tals que el contingut de TAG totals no variï. Llavors, l'aturada de síntesi de TAG partir de DAG de membrana implicaria l'aturada de la utilització dels TAG sintetitzats i emmagatzemats a gotícules. Si aquests TAG són els emprats per la resíntesi de PL, la condició de l'aturada de la utilització s'acompleix.

En el nostre cas, en les cèl·lules de dia 7 de cultiu, i de dia 7 de cultiu tractades amb ACSF es produiria la fusió de gotícules petites, donant lloc a gotícules més grans. El contingut total d'àcids grassos en lípids neutres (TAG+DAG+EstCol, taula 4.7) no canvia en cèl·lules C6 en condicions normals de cultiu, però si canviaria la mida del contenidor de llançadora/magatzem i es produiria una reorganització aparent de TAG entre les gotícules de diferents mides. Tant un augment transitori



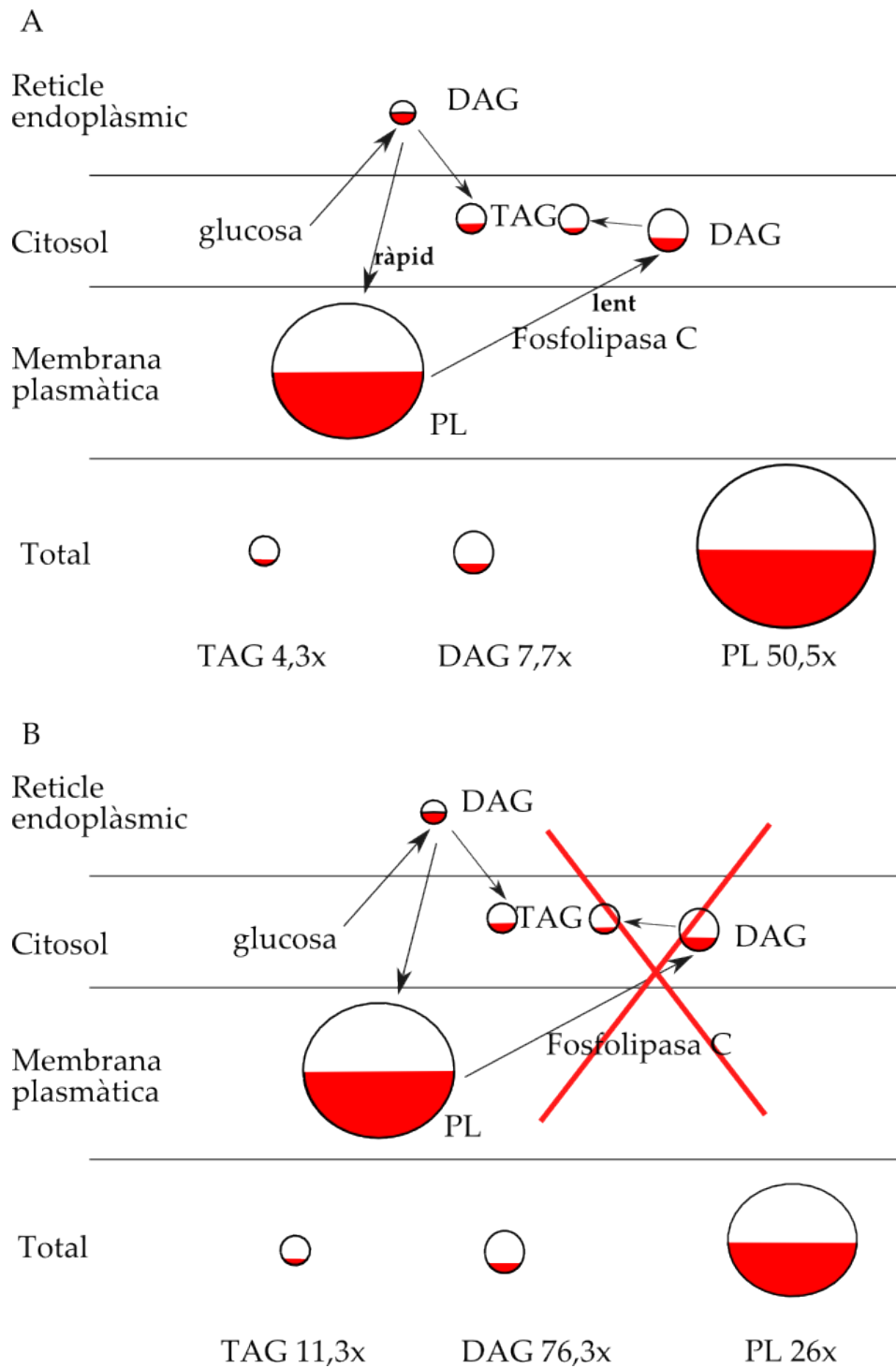


Figura 5.3: Descripció de la situació cel·lular en cultius de cèl·lules C6 segons les dades de marcatge. A- cèl·lules de dia 4 de cultiu; B- cèl·lules de dia 7 de cultiu. El significat de la grandària del *pool* marcat és el mateix de la figura 4.32

en la producció de DAG/TAG a nivell de membrana plasmàtica, com una disminució transitòria en el consum de DAG al RE, o els dos processos alhora, podrien augmentar el contingut aparent de ML i la seva detecció per RMN en els sistemes vius.

Pel què fa al paper que els éters de DAG i els plasmalògens podrien tenir en aquest esquema, els resultats de quantificació relativa de TLC mostren una disminució del contingut d'éters de DAG entre cèl·lules de dia 4 i de dia 7 de cultiu, i de dia 7 de cultiu incubades amb ACSF (veure secció 4.2.3). Tenint en compte que els éters de DAG provindrien de degradació de plasmalògens per acció de la PC-*plc*, i que aquest enzim es trobaria actiu en cèl·lules en proliferació activa (dia 4) i inactiu en cèl·lules en aturada de proliferació (dia 7 incubades amb ACSF), seria raonable esperar una disminució del seu contingut en cèl·lules en aturada de proliferació. Per altra banda, els experiments de marcatge mostren una incorporació de marcatge en les posicions que podrien correspondre a plasmalògens i/o éters de DAG (veure secció 4.5). Tenint en compte que el contingut d'éters de DAG sembla disminuir en cèl·lules en aturada de la proliferació, seria possible que aquests senyals provinguessin de plasmalògens de síntesi *de novo* i no d'éters de DAG. Està descrit a la bibliografia que els plasmalògens poden tenir un paper important en la fusió de membranes (Nagan & Zoeller, 2001), i sabent que, segons la hipòtesi formulada a la figura 5.2, en aturada de la proliferació es produirien processos de fusió de gotícules, podria ser necessària la presència de plasmalògens en les membranes de les gotícules per afavorir aquestes fusions, i per tant seria també possible que una part dels DAG formats a partir de la [1]-<sup>13</sup>C-glucosa es derivés cap a la síntesi d'aquests compostos.

En diversos sistemes apoptòtics en cèl·lules intactes i en tumors *in vivo*, s'han descrit augments en la intensitat dels senyals de ML detectats per RMN i en el contingut total de TAG mesurat en extractes orgànics, amb una acumulació concomitant

de gotícules lipídiques citosòliques (Engelmann *et al.*, 1996; Hakumaki & Kauppinen, 2000; Di Vito *et al.*, 2001; Al-Saffar *et al.*, 2002; Iorio *et al.*, 2003). També es va detectar una disminució en el contingut de PtdCho i de fosfolípids totals en diferents quantitats en sistemes apoptòtics. En aquest sentit, els processos apoptòtics serien equivalents a l'experiment de Ferretti i col·laboradors (Ferretti *et al.*, 1999) duts a terme amb l'addició de fosfolipasa C exògena. El precursor de TAG generat a nivell de membrana plasmàtica augmentaria sense que es produís un augment en la síntesi de PL a nivell de RE. Llavors, d'acord amb la figura 5.2 B es produiriria una acumulació de gotícules lipídiques visibles per RMN i epifluorescència, tal i com es descriu a la bibliografia en els casos d'apoptosi.

Per tant, el contingut en lípids mòbils (ML) visibles per RMN en cèl·lules C6 viable correlacionaria amb canvis en la proliferació cel·lular d'aquestes cèl·lules. Això estaria d'acord amb Bagnato i Igal (Bagnato & Igal, 2003) els quals van trobar que la sobreexpressió de DGAT en cèl·lules transformades SV 40 de fibroblasts de pulmó humà alentien la seva proliferació alhora que s'indueïa l'acumulació de gotícules lipídiques citosòliques, tot i que en aquest cas es produïa un augment en el contingut de TAG de 3,2 vegades en comparació amb cèl·lules SV 40 transformades.

Els ML podrien constituir doncs un sensor per canvis en la proliferació de cèl·lules tumorals, la qual cosa seria d'interès en aplicacions per monitoritzar la progressió o la resposta a teràpies en tumors *in vivo* (Murphy *et al.*, 2003; Tate *et al.*, 2006).

# Conclusions

- S'ha posat a punt un protocol de separació i quantificació de lípids neutres per cromatografia en capa prima i tinció amb *Coomassie Blue*. El protocol és quantitatiu i reproduïble en el rang de concentracions d'interès, i s'han identificat i eliminat totes les possibles interferències.
- S'ha posat a punt un protocol d'obtenció d'extractes lipídics de cèl·lules mitjançant solvents orgànics.
- S'ha caracteritzat la corba d'aparició de gotícules lipídiques citosòliques en les cèl·lules C6 ATCC. Aquesta corba presenta un comportament multimodal, augmentant primer el nombre de cèl·lules positives entre el dia de sembra i el dia 1 de cultiu, disminuint entre dia 1 i dia 4 de cultiu, i augmentant de nou fins a assolir un màxim a dia 7 de cultiu.
- S'ha demostrat que el contingut en triacilglicerols, diacilglicerols i esters de colesterol no canvia de manera significativa en cèl·lules C6 de glioma de ratxa en cultiu amb l'alentiment de la proliferació a densitat de saturació o per privació de sèrum o factors de creixement.
- S'ha demostrat que, mentre que el contingut en TAG no canvia, el contingut

aparent de lípids neutres detectats per epifluorescència o per RMN augmenta fins a un màxim de 29,5 vegades.

- S'ha posat a punt un mètode d'RMN bidimensional heteronuclear (HMQC) per la quantificació relativa de l'enriquiment en  $^{13}\text{C}$  de metabòlits en extractes lipídics de cèl·lules C6.
- S'ha demostrat mitjançant experiments de marcatge amb  $[1]\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa del metabolisme lipídic cel·lular que en cèl·lules C6 el metabolisme de PL, TAG i DAG ha d'estar compartimentat.
- Els resultats obtinguts en els experiments de marcatge amb  $[1]\text{-}^{13}\text{C}$ -glucosa del metabolisme lipídic cel·lular en cèl·lules C6 concordarien amb l'existència de resíntesi de TAG a partir de DAG i acil-CoA de manera associada a partícules lipídiques i/o membrana plasmàtica.
- Es proporciona una explicació cel·lular i biofísica per aquestes observacions postulant un transport associat a citoesquelet de gotícules de diferents mides que contenen TAG i la seva fusió dirigida per transport durant l'aturada de la proliferació fins a ser visibles per RMN i epifluorescència.

# Bibliografia

Ackerman, J.J., Grove, T.H., Wong, G.G., Gadian, D.G., & Radda, G.K. 1980. Mapping of Metabolites in Whole Animals by  $^{31}\text{P}$  Using Surface Coils. *Nature*, **283**, 167–170.

Al-Saffar, N.M., Titley, J.C., Robertson, D., Clarke, P.A., L.E.Jackson, Leach, M.O., & Ronen, S.M. 2002. Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br J Cancer.*, **86**, 963–970.

Almahbobi, G., Williams, L. J., Han, X. G., & Hall, P. F. 1993. Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells. *J Reprod Fertil*, **98**, 209–217.

Aoki, T., Hagiwara, H., & Fujimoto, T. 1997. Peculiar distribution of fodrin in fat-storing cells. *Exp Cell Res*, **234**, 313–320.

Atlas, S. W. 1991. *Magnetic resonance imaging of the brain and spine*. New York : Raven Press.

Bagnato, C., & Igal, R.A. 2003. Overexpression of diacylglycerol acyltransferase-1 reduces phospholipid synthesis, proliferation, and invasiveness in simian virus 40-transformed human lung fibroblasts. *J Biol Chem.*, **278**, 52203–52211.

Balaban, R. S., & Hampshire, V. A. 2001. Challenges in small animal noninvasive imaging. *ILAR J.*, **42**, 248–262.

- Barba, I., Cabañas, M. E., & Arús, C. 1999. The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res*, **59**, 1861–1868.
- Barba, I., Mann, P., Cabañas, M. E., Arús, C., & Gasparovic, C. 2001. Mobile lipid production after confluence and pH stress in perfused C6 cells. *NMR Biomed*, **14**, 33–40.
- Barton, S. J., Howe, F. A., Tomlins, A.M., Cudlip, S. A., Nicholson, J.K., Bell, B. A., & Griffiths, J. R. 1999. Comparison of in vivo  $^1\text{H}$  MRS of human brain tumours with  $^1\text{H}$  HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *MAGMA*, **8**, 121–128.
- Baudendistel, K. T., Heverhagen, J. T., & Knopp, M. V. 2004. Clinical MR at 3Tesla: current status. *Radiologe.*, **44**, 11–18.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370–371.
- Berger, S., & Braun, S. 2004. *200 and More NMR Experiments*. Wiley-VCH.
- Blankenberg, F. G., Katsikis, P. D., Storrs, R. W., Beaulieu, C., Spielman, D., Chen, J. Y., Naumovski, L., & Tait, J. F. 1997. Quantitative Analysis of Apoptotic Cell Death Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Blood*, **89**, 3778–3786.
- Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M. A., Borén, J., & Olofsson, S-O. 2005. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 1945–1951.
- Bouzier, A. K., Quesson, B., Valeins, H., Canioni, P., & Merle, M. 1999. [ $^{13}\text{C}$ ]glucose metabolism in the tumoral and nontumoral cerebral tissue of a glioma-bearing rat. *J Neurochem*, **72**, 2445–2455.

- Bozza, P. T., Payne, J. L., Morham, S. G., Langenbach, R., Smithies, O., & Weller, P. F. 1996. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11091–11096.
- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J., & Londos, C. 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*, **38**, 2249–2263.
- Brasaemle, D. L., D., G., S., L., & Wang, R. 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 46835–46842.
- Brown, F. F., Campbell, I. D., Kuchel, P. W., & Rabenstein, D. C. 1977. Human erythrocyte metabolism studies by  $^1\text{H}$  spin echo NMR. *FEBS Lett.*, **82**, 12–16.
- Brown, M. A., & Semelka, R. C. 1999. MR imaging abbreviations, definitions, and descriptions. A review. *Radiology*, **213**, 647–662.
- Cady, E. B., de L. Costello, A. M., Dawson, M.J., Delpy, D. T., Hope, P.L., & Reynolds, E. O. R. 1983. Non-invasive investigation of cerebral metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lancet*, **14**, 1059–1062.
- Callies, R., Sri-Pathmanathan, R.M., Ferguson, D.Y., & Brindle, K.M. 1993. The appearance of neutral lipid signals in the  $^1\text{H}$  NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets. *Magn Reson Med.*, **29**, 546–50.
- Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C. B., Lusis, A. J., Erickson, S. K., & Farese, R. V. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13018–13023.



Cases, S., Stone, S. J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K. D., Voelker, T., & Farese, R. V. 2001. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*, **276**, 38870–38876.

Cerdan, S., & Seelig, J. 1990. NMR studies of metabolism. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, **19**, 43–67.

Cerdán, S. 2003. <sup>13</sup>C NMR and cerebral biochemistry. *NMR in Biomed.*, **16**, 301–302.

Chen, J.-H., Enloe, B. M., Weybright, P., Campbell, N., D.Dorfman, Fletcher, C. D., Cory, D. G., & Singer, S. 2002. Biochemical correlates of thiazolidinedione-induced adipocyte differentiation by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn Reson Med*, **48**, 602–610.

Cheng, L. L., Chang, I. W., Louis, D. N., & Gonzalez, R. G. 1998. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res.*, **58**, 1825–1832.

Christiansen, K., & Jensen, P. K. 1972. Membrane-bound lipid particles from beef heart. Chemical composition and structure. *Biochim Biophys Acta*, **260**, 449–459.

Christie, W. W. 1973. *Lipid analysis : isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids*. Oxford New York : Pergamon Press.

Christie, W.W. 1990. Has thin-layer chromatography had its day? *Lipid technology*, **2**, 22–23.

Christie, W.W., & Dobson, G. 1999. Thin-layer chromatography-revisited. *Lipid technology*, **11**, 64–66.

Clausen, M. K., Christiansen, K., Jensen, P. K., & Behnke, O. 1974. Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett.*, **43**, 176–179.

- Coleman, R. A., & Lee, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, **43**, 134–176.
- Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J., & Willingham, M. C. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, **45**, 923–934.
- Cruz, F., & Cerdán, S. 1999. Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR studies of metabolic compartmentation in the adult mammalian brain. *NMR Biomed*, **12**, 451–462.
- Delikatny, E. J., Lander, C. M., Jeitner, T. M., Hancock, R., & Mountford, C. E. 1996a. Modulation of MR-visible mobile lipid levels by cell culture conditions and correlations with chemotactic response. *Int J Cancer*, **65**, 238–245.
- Delikatny, E. J., Roman, S. K., Hancock, R., Jeitner, T. M., Lander, C. M., Rideout, D. C., & Mountford, C. E. 1996b. Tetraphenylphosphonium chloride induced MR-visible lipid accumulation in a malignant human breast cell line. *Int J Cancer*, **67**, 72–79.
- Delikatny, E. J., & Jeitner, T. M. 1997. The accumulation of  $^1\text{H}$  MR-visible lipid human glioma cells is independent of the cell cycle. *International Journal of Oncology*, **11**, 543–550.
- Delikatny, E.J., Brammah, W.A. Cooperand S., Sathasivam, N., & D.C.Rideout. 2002. Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res.*, **62**, 1394–400.
- Delikatny, E.J., & Poptani, H. 2005. MR techniques for in vivo molecular and cellular imaging. *Radiol Clin North Am*, **43**, 205–220.
- Dennis, E. A., & Kennedy, E. P. 1972. Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J Lipid Res*, **13**, 263–267.

Dessi, S., Batetta, B., Pulisci, D., Spano, O., Cherchi, R., Lanfranco, G., Tessitore, L., Costelli, P., Baccino, F. M., & Anchisi, C. 1992. Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer. *Oncology*, **49**, 436–441.

Di Vito, M., Lenti, L., Knijn, A., Iorio, E., D'Agostino, F., Molinari, A., Calcabrini, A., Stringaro, A., Meschini, S., Arancia, G., Bozzi, A., Strom, R., & Podo, F. 2001.  $^1\text{H}$  NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells. *Biochim Biophys Acta*, **1530**, 47–66.

DiAugustine, R. P., Schaefer, J. M., & Fouts, J. R. 1973. Hepatic lipid droplets. Isolation, morphology and composition. *Biochem J*, **132**, 323–327.

Eakin, R. T., Morgan, L. O., Gregg, C. T., & Matwiyoff, N. A. 1972. *FEBS Letters*, **28**, 259.

Ende, D., Rutter, A., Russell, P., & Mountford, C.E. 1996. Chemical Shift Imaging of Human Colorectal Tissue (Ex Vivo). *NMR in biomedicine*, **9**, 179–183.

Engelmann, J., Henke, J., Willker, W., Kutscher, B., Nossner, G., Engel, J., & Leibfritz, D. 1996. Early stage monitoring of miltefosine induced apoptosis in KB cells by multinuclear NMR spectroscopy. *Anticancer Res.*, **16**, 1429–1439.

Erickson, S. K., Cooper, A. D., Barnard, G. F., Havel, C. M., Watson, J. A., Feingold, K. R., Moser, A. H., Hughes-Fulford, M., & Siperstein, M. D. 1988. Regulation of cholesterol metabolism in a slow-growing hepatoma in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **960**, 131–138.

Ferretti, A., Knijn, A., Iorio, E., Pulciani, S., Giambenedetti, M., Molinari, A., Meschini, S., Stringaro, A., Calcabrini, A., Freitas, I., Strom, R., Arancia, G., & Podo, F. 1999. Biophysical and structural characterization of  $^1\text{H}$ -NMR-detectable mobile lipid domains in NIH-3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1438**, 329–348.

- Ferretti, A., Knijn, A., Raggi, C., & Sargiacomo, M. 2003. High-resolution proton NMR measures mobile lipids associated with Triton-resistant membrane domains in haematopoietic K562 cells lacking or expressing caveolin-1. *Eur Biophys J.*, **32**, 83–95.
- Findlay, J.B.C., & Evans, W.H. (eds). 1987. *Biological membranes: a practical approach*. IRL Press.
- Finer, E. G., Flook, A. G., & Hauser, H. 1972a. Mechanism of sonication of aqueous egg yolk lecithin dispersions and nature of the resultant particles. *Biochim Biophys Acta*, **260**, 49–58.
- Finer, E. G., Flook, A. G., & Hauser, H. 1972b. The nature and origin of the NMR spectrum of unsonicated and sonicated aqueous egg yolk lecithin dispersions. *Biochim Biophys Acta*, **260**, 59–69.
- Finstad, H. S., Drevon, C. A., Kulseth, M. A., Synstad, A. V., Knudsen, E., & Kolset, S. O. 1998. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem J*, **336**, 451–459.
- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Delfino, J. M., Stegmann, T., & Rasmussen, H. 1992. Metabolic fate of plasma membrane diacylglycerols in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, **267**, 14783–14789.
- Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Delfino, J. M., & Rasmussen, H. 1993. New patterns of diacylglycerol metabolism in intact cells. *Biochem J*, **289**, 783–788.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. Sloane. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497–509.
- Foxall, D. L., Cohen, J. S., & Mitchell, J. B. 1984. Continuous perfusion of mammalian cells embedded in agarose gel threads. *Exp Cell Res*, **154**, 521–529.

Franke, W. W., Hergt, M., & Grund, C. 1987. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*, **49**, 131–141.

Freeman, R. 2003. *Magnetic resonance in chemistry and medicine*. Oxford University Press.

Freitas, I. 1990. Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *J Photochem Photobiol B*, **7**, 359–361.

Freitas, I., Pontiggia, P., Barni, S., Bertone, V., Parente, M., Novarina, A., Roveta, G., Gerzelli, G., & Stoward, P. 1990. Histochemical Probes for the Detection of Hypoxic Tumour Cells. *Anticancer Research*, **10**, 613–622.

Friebolin, H. 2005. *Basic one- and two dimensional NMR spectroscopy*. Wiley-VCH.

Fujimoto, Y., Itabe, H., S., J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S., & Takano, T. 2004. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 47–59.

Gadian, D. G. 1995. *NMR and its applications to living systems*. Oxford Science.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. M., & Desjardins, M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119–131.

García-Espinosa, M. A., Rodrigues, T. B., Sierra, A., Benito, M., Fonseca, C., Gray, H. L., Bartnik, B. L., García-Martín, M. L., Ballesteros, P., & Cerdán, S. 2004. Cerebral glucose metabolism and the glutamine cycle as detected by in vivo and in vitro <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Neurochem Int*, **45**, 297–303.

- Gillies, R. J., & Morse, D. L. 2005. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **7**, 287–326.
- Gillies, R. J., Barry, J. A., & Ross, B. D. 1994. *In vitro* and *in vivo*  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR analyses of phosphocholine metabolism in rat glioma cells. *Magnetic Resonance in Medicine*, **32**, 310–318.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., & Fowler, S. D. 1985. Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.*, **100**, 965–973.
- Griffiths, J. R., Cady, F., Edwards, R. H. T., McCready, V.R., Wilkie, D.R., & Wiltschaw, E. 1983.  $^{31}\text{P}$  NMR Studies of a Human Tumor *in situ*. *Lancet*, **1**, 1435–1436.
- Grobben, Bert, Deyn, Peter Paul De, & Slegers, Herman. 2002. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*, **310**(3), 257–270.
- Gruber, S., Stadlbauer, A., Mlynarik, V., Gatterbauer, B., Roessler, K., & Moser, E. 2005. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in brain tumor diagnosis. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, **16**, 101–114.
- Guilbaud, N. F., Gas, N., Dupont, M. A., & Valette, A. 1990. Effects of differentiation-inducing agents on maturation of human MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol*, **145**(1), 162–172.
- Guyton, J. R., & Klemp, K. F. 1988. Ultrastructural discrimination of lipid droplets and vesicles in atherosclerosis: value of osmium-thiocarbohydrazide-osmium and tannic acid-paraphenylenediamine techniques. *J Histochem Cytochem*, **36**, 1319–1328.
- Hailey, D. 1997. An assessment of the status of magnetic resonance imaging in health care. *J. Qual. Clin. Pract.*, **17**, 221–230.

Hakumaki, J., & Kauppinen, R. 2000.  $^1\text{H}$ - NMR visible lipids in the life and death of cells. *TIBS*, **25**, 357–362.

Hakumaki, J.M., Poptani, H., Sandmair, A.M., Yla-Herttuala, S., & Kauppinen, R.A. 1999.  $^1\text{H}$ - MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med.*, **5**, 1323–7.

Heid, H. W., Schnölzer, M., & Keenan, T. W. 1996. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem J*, **320**, 1025–1030.

Henke, J., Willker, W., Engelmann, J., & Leibfritz, D. 1996. Combined extraction techniques of tumour cells and lipid/phospholipid assignment by two dimensional NMR spectroscopy. *Anticancer Research*, **16**, 1417–1428.

Hirakawa, T., Mayurama, K., Kohl, N. E., Kodama, T., & Ruley, H. E. 1991. Massive accumulation of neutral lipids in cells conditionally transformed by an activated H-ras oncogene. *Oncogene*, **6**, 289–295.

Holmes, K.T., Williams, P.G., King, N.J., May, G.L., Dyne, M., Bloom, M., & Mountford, C.E. 1987. A comparison of the chemical analyses of cell lipids with their complete proton NMR spectrum. *Magn Reson Med.*, **4**, 567–74.

Hoult, D., Busby, S., Gadian, D., Radda, G., Richards, R., & Seeley, P. 1974. Observation of Tissue Metabolites Using  $^{31}\text{P}$ -Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*, **252**, 285–287.

Howe, F.A., & Opstad, K.S. 2003.  $^1\text{H}$ - MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed.*, **16**, 123–31.

- Igal, R. A., Caviglia, J. M., de Gómez Dumm, I. N., & Coleman, R. A. 2001. Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is used for triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res*, **42**, 88–95.
- Iorio, E., Vito, M. Di, Spadaro, F., Ramoni, C., Lococo, E., Carnevale, R., Lenti, L., Strom, R., & Podo, F. 2003. Triacsin C inhibits the formation of <sup>1</sup>H- NMR-visible mobile lipids and lipid bodies in HuT 78 apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1634**, 1–14.
- Jackowski, S. 1994. Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. *J Biol Chem*, **269**, 3858–3867.
- Jackowski, S. 1996. Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem*, **271**, 20219–20222.
- Jackowski, S., & Fagone, P. 2005. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem*, **280**, 853–856.
- Jackowski, S., Wang, J., & Baburina, I. 2000. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta*, **1483**, 301–315.
- Jensen, P. K., & Kofod, B. 1966. Isolation from beef-heart homogenate of a particulate lipoprotein containing beta-carotene. *Biochim Biophys. Acta*, **22**, 475–588.
- Jodalén, H., Stangeland, L., Grong, K., Vik-Mo, H., & Lekven, J. 1985. Lipid accumulation in the myocardium during acute regional ischaemia in cats. *J Mol Cell Cardiol*, **17**, 973–980.
- Julià-Sapé, M., Acosta, D., Mier, M., Arús, C., Watson, D., & consortium, I. N. T. E. R. P. R. E. T. 2006. A multi-centre, web-accessible and quality control-checked database of in vivo MR spectra of brain tumour patients. *MAGMA*, **19**, 22–33.



Kabir, J., Lobo, M., & Zachary, I. 2002. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J*, **367**, 145–155.

Kamisaka, Y., Mishra, S., & Nakahara, T. 1997. Purification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from the lipid body fraction of an oleaginous fungus. *J Biochem (Tokyo)*, **121**, 1107–1114.

Kamisaka, Y., Noda, N., Sakai, T., & Kawasaki, K. 1999. Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Biochim Biophys Acta*, **1438**, 185–198.

Kapuscinski, J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*, **70**, 220–233.

Keeler, James. 2004. Understanding NMR spectroscopy. *In: Understanding NMR spectroscopy*.

Kepes, J. J., & Rubinstein, L. J. 1981. Malignant gliomas with heavily lipidized (foamy) tumor cells: a report of three cases with immunoperoxidase study. *Cancer*, **47**, 2451–2459.

Knijn, A., Ferretti, A., Zhang, P. J., Giambenedetti, M., Molinari, A., Meschini, S., Pulciani, S., & Podo, F. 1997. Lower levels of <sup>1</sup>H MRS-visible mobile lipids in H-ras transformed tumorigenic fibroblasts with respect to their untransformed parental cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **43**, 691–701.

Krämer, S. D., Hurley, J. A., Abbott, N. J., & Begley, D. J. 2002. Lipids in blood-brain barrier models in vitro I: Thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the analysis of lipid classes and long-chain polyunsaturated fatty acids. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **38**, 557–565.

- Kuesel, A.C., Sutherland, G.R., Halliday, W., & Smith, I.C. 1994a.  $^1\text{H}$ - MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. *NMR Biomed.*, **7**, 149–55.
- Kuesel, A.C., Donnelly, S.M., Halliday, W., Sutherland, G.R., & Smith, I.C. 1994b. Mobile lipids and metabolic heterogeneity of brain tumours as detectable by ex vivo  $^1\text{H}$  MR spectroscopy. *NMR Biomed.*, **7**, 172–80.
- Lahrech, H., Zoula, S., Farion, R., Rémy, C., & Décorps, M. 2001. In vivo measurement of the size of lipid droplets in an intracerebral glioma in the rat. *Magn Reson Med.*, **45**, 409–14.
- Lauterbur, P. C. 1973. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*, **242**, 190–191.
- Lavietes, B. B., & Coleman, P. S. 1980. The role of lipid metabolism in neoplastic differentiation. *J Theor Biol*, **85**, 523–542.
- Lee, K. Y. 1971. Loss of lipid to plastic tubes. *Journal of Lipid Research*, **12**, 635–636.
- Lieber, J. G., & Evans, R. M. 1996. Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci*, **109**, 3047–3058.
- Litchfield, C. 1972. *Analysis of triglycerides*. New York London : Academic Press.
- Londos, C., Brasaemle, D. L., Gruia-Gray, J., Servetnick, D. A., Schultz, C. J., Levin, D. M., & Kimmel, A. R. 1995. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans*, **23**, 611–615.

- Mackinnon, W. B., May, G. L., & Mountford, C. E. 1992. Esterified cholesterol and triglyceride are present in plasma membranes of Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*, **205**, 827–839.
- Majós, C., Alonso, J., Aguilera, C., Serrallonga, M., Acebes, J. J., Arús, C., & Gili, J. 2002. Adult primitive neuroectodermal tumor: proton MR spectroscopic findings with possible application for differential diagnosis. *Radiology*, **225**, 556–566.
- Mansfield, P., & Maudsley, A.A. 1976. Planar and line-scan spin imaging by NMR. *In: Proc.XIXth Congress Ampere, Heidelberg*.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A., & Brasaemle, D. L. 2006. The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem*, **281**, 11901–11909.
- Martínez-Pérez, I., Moreno, A., Barba, I., Capdevila, A., & Arús, C. 1996. Large Lipid Droplets Observed by Electron Microscopy in Six Human Brain Tumours with  $^1\text{H}$  MRS in vivo pattern. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine 4th Scientific Meeting Program*, 976.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. 2000. *Biochemistry*. Robin Heyden.
- Maxwell, R. J., Martínez-Pérez, I., Cerdán, S., Cabañas, M. E., Arús, C., Moreno, A., Capdevila, A., Ferrer, E., Bartomeus, F., Aparicio, A., Conesa, G., Roda, J. M., Carceller, F., Pascual, J. M., Howells, S. L., Mazucco, R., & Griffiths, J. R. 1998. Pattern recognition analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra from perchloric acid extracts of human brain tumor biopsies. *Magn Reson Med*, **39**, 869–877.
- May, G. L., Wright, L. C., Holmes, K. T., Williams, P. G., Smith, I. C., Wright, P. E., Fox, R. M., & Mountford, C. E. 1986. Assignment of methylene proton resonances in NMR spectra of embryonic and transformed cells to plasma membrane triglyceride. *J Biol Chem*, **261**, 3048–3053.

- May, G.L., Wright, L.C., Obbink, K.G., Byleved, P.M., Garg, M.L., Ahmad, Z.I., & Sorrell, T.G. 1997. Increased Saturated Triacylglycerol Levels in Plasma Membrane of Human Neutrophils Stimulated by Lipopolysaccharide. *Journal of Lipid Research*, **38**, 1562–1570.
- Meneses, P., & Glonek, T. 1988. High resolution  $^{31}\text{P}$  NMR of extracted phospholipids. *Journal of Lipid Research*, **29**, 679–689.
- Merle, M., Pianet, I., Canioni, P., & Labouesse, J. 1992. Comparative  $^{31}\text{P}$  and  $^1\text{H}$  NMR studies on rat astrocytes and C6 glioma cells in culture. *Biochimie*, **74**, 919–930.
- Michaelis, L., & Schlieper, P. 1982. 500 MHz  $^1\text{H}$  NMR of phospholipid liposomes: lanthanide shift on glycerol-gamma and acyl-chain C2 resonances. *FEBS Lett*, **147**, 40–44.
- Milkevitch, M., Shim, H., Pilatus, U., Pickup, S., Wehrle, J.P., Samid, D., Poptani, H., Glickson, J.D., & Delikatny, E.J. 2005. Increases in NMR-visible lipid and glycerophosphocholine during phenylbutyrate-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.*, **1734**, 1–12.
- Modo, M., Hoehn, M., & Bulte, J. W. M. 2005. Cellular MR imaging. *Mol Imaging*, **4**, 143–164.
- Moon, R. B., & Richards, J.H. 1973. Determination of Intracellular pH by  $^{31}\text{P}$  Magnetic resonance. *Journal of Biological Chemistry*, **248**, 7276–7278.
- Moreno, A., Rey, M., Montane, J. M., Alonso, J., & Arús, C. 1993.  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of colon tumors and normal mucosal biopsies; elevated taurine levels and reduced polyethyleneglycol absorption in tumors may have diagnostic significance. *NMR Biomed*, **6**(2), 111–118.

Mountford, C. E., Wright, L. C., Holmes, K. T., Mackinnon, W. B., Gregory, P., & Fox, R. M. 1984. High-resolution proton nuclear magnetic resonance analysis of metastatic cancer cells. *Science*, **226**, 1415–1418.

Mountford, C. E., Mackinnon, W. B., Russell, P., Rutter, A., & Delikatny, E. J. 1996. Human cancers detected by proton MRS and chemical shift imaging ex vivo. *Anti-cancer Res*, **16**, 1521–1531.

Mountford, C.E., & Wright, L.C. 1988. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model. *Trends Biochem Sci.*, **13**, 172–177.

Mountford, C.E., Reid, G. Grossmanand G., & Fox, R.M. 1982. Characterization of transformed Cells and tumors by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.*, **42**, 2270–2276.

Moyec, L. Le, Tatoud, R., Degeorges, A., Calabresse, C., Bauza, G., Eugène, M., & Calvo, F. 1996. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals cellular lipids involved in resistance to adriamycin and taxol by the K562 leukemia cell line. *Cancer Res*, **56**, 3461–3467.

Moyec, L. Le, Millot, G., Tatoud, R., Calvo, F., & Eugène, M. 1997. Lipid signals detected by NMR proton spectroscopy of whole cells are not correlated to lipid droplets evidenced by the Nile red staining. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **43**, 703–709.

Murphy, D. J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*, **40**, 325–438.

Murphy, D.J., & Vance, J. 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Bioc-hem Sci*, **24**, 109–15.

- Murphy, P.S., Rowland, I.J., Viviers, L., Brada, M., Leach, M.O., & Dzik-Jurasz, A.S. 2003. Could assessment of glioma methylene lipid resonance by in vivo (1)H-MRS be of clinical value? *Br J Radiol.*, **76**, 459–63.
- Nadal, L., Leray, G., Desbarats, C., Darcel, F., Bansard, J. Y., Bondon, A., & de Certaines, J. D. 1997. Proton and phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of human brain tumor extracts with automatic data classification: a preliminary study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **43**, 659–673.
- Nagan, N., & Zoeller, R. A. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res*, **40**, 199–229.
- Nakamura, K., & Handa, S. 1984. Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal Biochem*, **142**, 406–410.
- Negendank, W.G., & Sauter, R. 1996. Intratumoral lipids in 1H MRS in vivo brain tumors: experience of the Siemens cooperative clinical trial. *Anticancer Res.*, **16**, 1533–1538.
- Nygren, C., von Holst, H., Månsson, J. E., & Fredman, P. 1997. Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain. *Br J Neurosurg*, **11**, 216–220.
- Öst, A., Ortegren, U., Gustavsson, J., Nystrom, F. H., & Strålfors, P. 2005. Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 5–8.
- Pagano, R. E., & Longmuir, K. J. 1985. Phosphorylation, transbilayer movement, and facilitated intracellular transport of diacylglycerol are involved in the uptake of a fluorescent analog of phosphatidic acid by cultured fibroblasts. *J Biol Chem*, **260**, 1909–1916.

Parks, J. S., & Hauser, H. 1996. Low density lipoprotein particle size and core cholesteryl ester physical state affect the proton NMR magnetic environment of fatty acid methylene and methyl nuclei. *J Lipid Res*, **37**, 1289–1297.

Parlo, R. A., & Coleman, P. S. 1984. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *J Biol Chem*, **259**, 9997–10003.

Pelech, S. L., & Vance, D. E. 1984. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, **779**, 217–251.

Pelech, S. L., Cook, H. W., Paddon, H. B., & Vance, D. E. 1984. Membrane-bound CTP:phosphocholine cytidyltransferase regulates the rate of phosphatidylcholine synthesis in HeLa cells treated with unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **795**, 433–440.

Pérez, Y., Cabañas, M.E., Quintero, M.R., & Arús, C. 2000.  $T_2$  relaxation measurements in lipid droplets from C6 cells. *MAGMA*, **11**, 193–194.

Pérez, Y. 2000. *Caracterización biofísica del compartimento subcelular que contiene lípidos móviles en células C6 de glioma de rata mediante  $^1\text{H}$ -RMN*. Ph.D. thesis, Dept Bioquímica i Biologia Molecular Universitat Autònoma de Barcelona.

Pérez, Y., Lahrech, H., Cabañas, M.E., Barnadas, R., Sabes, M., Rémy, C., & Arús, C. 2002. Measurement by nuclear magnetic resonance diffusion of the dimensions of the mobile lipid compartment in C6 cells. *Cancer Res.*, **62**, 5672–7.

Petresch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W., Castells, J., & Camps, F. 1996. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Alhambra Longman.

Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S. D., Zellnig, G., Perktold, A., & Daum, G. 2001. A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum

associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem*, **268**, 2351–2361.

Pirko, I., Fricke, S. T., Johnson, A. J., Rodriguez, M., & Macura, S. I. 2005. Magnetic resonance imaging, microscopy and spectroscopy of central nervous system in experimental animals. *NeureRx*, **2**, 250–264.

Podo, F. 1999. Tumour phospholipid metabolism. *NMR in Biomed.*, **12**, 413–439.

Podo, F., Ferretti, A., Knijn, A., Zhang, P., Ramoni, C., Barletta, B., Pini, C., Baccarini, S., & Pulciani, S. 1996. Detection of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NIH-3T3 fibroblasts and their H-ras transformants: NMR and immunochemical studies. *Anticancer Res*, **16**, 1399–1412.

Polokoff, M. A., & Bell, R. M. 1980. Solubilization, partial purification and characterization of rat liver microsomal diacylglycerol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, **618**, 129–142.

Poptani, H., Kaartinen, J., Gupta, R. K., Niemitz, M., Hiltunen, Y., & Kauppinen, R. A. 1999. Diagnostic assessment of brain tumours and non-neoplastic brain disorders in vivo using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks. *J Cancer Res Clin Oncol*, **125**, 343–349.

Portais, J. C., Schuster, R., Merle, M., & Canioni, P. 1993. Metabolic flux determination in C6 glioma cells using carbon-13 distribution upon [1-<sup>13</sup>C]glucose incubation. *Eur J Biochem*, **217**, 457–468.

Portais, J. C., Voisin, P., Merle, M., & Canioni, P. 1996. Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR. *Biochimie*, **78**, 155–164.

Posse, S., Schuknecht, B., Smith, M.E., van Zijl, P.C.M., Herschkowitz, N., & Moonen, C.T. 1993. Short echo time proton MR spectroscopic imaging. *J.Comput. Asist. Tomogr*, **17**, 1–14.



Preul, M.C., Caramanos, Z., Collins, D.L., Villemure, J-G., Leblanc, R., Olovier, A., Pokrupa, R., & Arnold, D.L. 1996. Accurate, non-invasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med.*, **2**, 323–325.

Quintero, M.R., Candiota, A.P., Cabañas, M.E., & Arús, C. 2001. *Modulación de la acumulación de lípidos neutros en células C6 de glioblastoma de rata por las condiciones de cultivo celular*. Congrès de la SEBBM València.

Quintero, M.R., Cabañas, M. E., & Arús, C. 2007. A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of lipids*, **1771**, 31–44.

Ramírez de Molina, A., Gutiérrez, R., Ramos, M. A., Silva, J. M., Silva, J., Bonilla, F., Sánchez, J.J., & Lacal, J. C. 2002a. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, **21**, 4317–4322.

Ramírez de Molina, A., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, R., Martínez-Piñeiro, L., Sánchez, J., Bonilla, F., Rosell, R., & Lacal, J. C. 2002b. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 580–583.

Reckel, Sina, Löhr, Frank, & Dötsch, Volker. 2005. In-cell NMR spectroscopy. *Chem-biochem*, **6**, 1601–1606.

Rémy, C., Fouilhe, N., Barba, I., Sam-Lai, E., Lahrech, H., Cucurella, M.G., Izquierdo, M., Moreno, A., Ziegler, A., Massarelli, R., Décorps, M., & Arús, C. 1997. Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res.*, **57**, 407–414.

Rice, J. A. 1995. *Mathematical statistics and data analysis*. Belmont Duxbury Press.

- Rodríguez, E., Roig, A., Molins, E., Arús, C., Quintero, M.R., Cabañas, M. E., Cerdán, S., López-Larrubia, P., & Santfeliu, C. 2005. *In vitro* characterization of an  $F_{e8}$  cluster as potential MRI contrast agent. *NMR in Biomed.*, **18**, 300–307.
- Roessler, P. G. 1988. *J. Phycol.*, **24**, 394–400.
- Roman, S. K., Jeitner, T. M., Hancock, R., Cooper, W. A., Rideout, D. C., & Delikatny, E. J. 1997. Induction of magnetic resonance-visible lipid in a transformed human breast cell line by tetraphenylphosphonium chloride. *Int J Cancer*, **73**, 570–579.
- Rosi, A., Luciani, A.M., Matarrese, P., Arancia, G., Viti, V., & Guidoni, L. 1999.  $^1\text{H}$ -MRS lipid signal modulation and morphological and ultrastructural changes related to tumor cell proliferation. *Magn Reson Med.*, **42**, 248–57.
- Röser, K., Bohn, W., Giese, G., & Mannweiler, K. 1991. Subclones of C6 rat glioma cells differing in intermediate filament protein expression. *Exp Cell Res*, **197**, 200–206.
- Ross, B. D., Radda, G. K., Gadian, D. G., Rocker, G., Esiri, M., & Falconer-Smith, J. 1981. Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *New Eng. J. Med.*, **304**, 1338–1342.
- Rubin, H., & Trelease, R. N. 1976. Subcellular localization of glyoxylate cycle enzymes in *Ascaris suum* larvae. *J Cell Biol*, **70**, 374–383.
- Sabine, J. R. 1976. Metabolic controls in precancerous liver-VII. Time course of loss of dietary feedback control of cholesterol synthesis during carcinogen treatment. *Eur J Cancer*, **12**, 299–303.
- Sathasivam, N.i, Brammah, S., Wright, L. C., & Delikatny, E. J. 2003. Inhibition of tetraphenylphosphonium-induced NMR-visible lipid accumulation in human breast cells by chlorpromazine. *Biochim Biophys Acta*, **1633**, 149–160.

Schlunk, F. F., & Lombardi, B. 1967. Liver liposomes. I. Isolation and chemical characterization. *Lab Invest*, **17**, 30–38.

Schneeberger, E. E., Lynch, R. D., & Geyer, R. P. 1971. Formation and disappearance of triglyceride droplets in strain L fibroblasts. An electron microscopic study. *Exp Cell Res*, **69**, 193–206.

Schroeder, F., Kier, A. B., Olson, C. D., & Dempsey, M. E. 1984. Correlation of tumor metastasis with sterol carrier protein and plasma membrane sterol levels. *Biochem Biophys Res Commun*, **124**, 283–289.

Sequin, U., & Scott, A. I. 1974. C-13 as a label in biosynthetic studies. *Science*, **186**, 101–107.

Sijens, P. 2005. Combining New MRI Methods - MR Spectroscopy, Functional MRI, Diffusion Tensor Imaging. *Imaging Decisions MRI*, **9**, 39–48.

Sijens, P. E., & Oudkerk, M. 2005. Clinical magnetic resonance spectroscopy. *Imaging decisions*, **1**, 23–38.

Slagel, D. E., Dittmer, J. C., & Wilson, C. B. 1967. Lipid composition of human glial tumour and adjacent brain. *J Neurochem*, **14**, 789–798.

Sorensen, A. G. 2006. Magnetic resonance as a cancer imaging biomarker. *J Clin Oncol*, **24**, 3274–3281.

Sorger, D., & Daum, G. 2003. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, **61**, 289–299.

Stasio, G. De, Casalbore, P., Pallini, R., Gilbert, B., Sanità, F., Ciotti, M. T., Rosi, G., Festinesi, A., Larocca, L. M., Rinelli, A., Perret, D., Mogk, D. W., Perfetti, P., Mehta, M. P., & Mercanti, D. 2001. Gadolinium in human glioblastoma cells for gadolinium neutron capture therapy. *Cancer Res*, **61**, 4272–4277.

Targett-Adams, P., Chambers, D., Gledhill, S., Hope, R. G., Coy, J. F., Girod, A., & McLauchlan, J. 2003. Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J Biol Chem*, **278**, 15998–16007.

Tate, A. R., Majós, C., Moreno, A., Howe, F. A., Griffiths, J. R., & Arús, C. 2003. Automated classification of short echo time in in vivo 1H brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med*, **49**, 29–36.

Tate, A. R., Underwood, J., Acosta, D. M., M.Julià-Sapé, Majós, C., Moreno-Torres, A., Howe, F. A., van der Graaf, M., Lefournier, V., Murphy, M. M., Loosemore, A., Ladroue, C., Wesseling, P., Bosson, J. L., Cabañas, M. E., Simonetti, A. W., Gajewicz, W., Calvar, J., Capdevila, A.i, Wilkins, P. R., Bell, B. A., Rémy, C., Heerschap, A., Watson, D., Griffiths, J. R., & Arús, C. 2006. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed*, **19**, 411–434.

Tate, A.R., Griffiths, J.R., Martínez-Pérez, I., Moreno, A., Barba, I., Cabañas, M.E., Watson, D., Alonso, J., Bartomeus, F., Isamat, F., Ferrer, I., Vila, F., Ferrer, E., Capdevila, A., & Arús, C. 1998. Towards a method for automated classification of 1H MRS spectra from brain tumours. *NMR in Biomed.*, **11**, 177–191.

Traub, P., Perides, G., Scherbarth, A., & Traub, U. 1985. Tenacious binding of lipids to vimentin during its isolation and purification from Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett*, **193**, 217–221.

Valencia-Turcotte, L., & Rodríguez-Sotres, R. 2001. The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, **1534**, 14–26.

Valverde, D., Quintero, M. R., Candiota, A. P., Badiella, L., Cabañas, M. E., & Arús, C. 2006. Analysis of the changes in the (1)H NMR spectral pattern of perchloric acid extracts of C6 cells with growth. *NMR Biomed*, **19**, 223–230.

van Helvoort, A., van't Hof, W., Ritsema, T., Sandra, A., & van Meer, G. 1994. Conversion of diacylglycerol to phosphatidylcholine on the basolateral surface of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. Evidence for the reverse action of a sphingomyelin synthase. *J Biol Chem*, **269**, 1763–1769.

Vance, J. E. 1998. Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: the same but not the same. *Trends Biochem Sci*, **23**, 423–428.

Veale, M. F., Roberts, N. J., King, G. F., & King, N. J. 1997. The generation of 1H-NMR-detectable mobile lipid in stimulated lymphocytes: relationship to cellular activation, the cell cycle, and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun*, **239**, 868–874.

Wahlroos, T., Soukka, J., Denesyuk, A., Wahlroos, R., Korpela, T., & Kilby, N. J. 2003. Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells. *Genesis*, **35**, 125–132.

Watanabe, T. 2002. Recent topics in NMR imaging and MRI. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*, **1**, 38–49.

Weller, P. F., Ackerman, S. J., Nicholson-Weller, A., & Dvorak, A. M. 1989. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol*, **135**, 947–959.

Weller, P. F., Ryeom, S. W., Picard, S. T., Ackerman, S. J., & Dvorak, A. M. 1991. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol*, **113**, 137–146.

Williams, P. G., Helmer, M. A., Wright, L. C., Dyne, M., Fox, R. M., Holmes, K. T., May, G. L., & Mountford, C. E. 1985. Lipid domain in cancer plasma membrane shown by  $^1\text{H}$ -NMR to be similar to a lipoprotein. *FEBS letters*, **192**, 159–164.

Wright, L. C., May, G. L., Dyne, M., & Mountford, C. E. 1986. A proteolipid in cancer cells is the origin of their high-resolution NMR spectrum. *FEBS Letters*, **203**, 164–168.

Wright, L.C., Obbink, K.L. Groot, Delikatny, E.J., Santangelo, R.T., & Sorrell, T.C. 2000. The Origin of H- NMR-Visible Triacylglycerol in Human Neutrophils. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 68–78.

Wright, L.C., Djordjevic, J.T., Schibeci, S.D., Himmelreich, U., Muljadi, N., Williamson, P., & Lynch, G.W. 2003. Detergent-resistant membrane fractions contribute to the total  $^1\text{H}$  NMR-visible lipid signal in cells. *Eur J Biochem.*, **270**, 2091–100.

Zoula, S., Hérigault, G., Ziegler, A., Farion, R., Décorps, M., & Rémy, C. 2003a. Correlation between the occurrence of  $^1\text{H}$ -MRS lipid signal, necrosis and lipid droplets during C6 rat glioma development. *NMR in Biomed*, **16**, 199–212.

Zoula, S., Rijken, P.F., Peters, J.P., Farion, R., der Sanden, B.P. Van, der Kogel, A.J. Van, Décorps, M., & Rémy, C. 2003b. Pimonidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection. *Br J Cancer.*, **88**, 1439–44.

Zweytick, D., Athenstaedt, K., & Daum, G. 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim et Biophys Acta*, **1469**, 101–120.



# Annex

## A.1 Programa de polsos dels experiments monodimensionals de pols i adquisició de $^1\text{H}$ -RMN

```
;gabrmn_zgpr
;arx-version
;1D sequence with presaturation

;;d12=20u
;;d13=4u

1 ze
2 d1
  d12 t12
  p18 ph29
  d13
  d12 t10
  p1 ph1
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph29=0
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;t10: transmitter high power level
```



```
;t12: transmitter power level for presaturation  
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse  
;p18: presaturation during relaxation delay  
;d12: delay for power switching [20 usec]  
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
```

## A.2 Programa de polsos dels experiments monodimensionals d'eco d'spin de <sup>1</sup>H-RMN

```

; jrhard_SeqDecorps
;
; MEC, SeRMN-UAB - c. 1997
; spin(jump and return)-echo pulse sequence
; with presaturation
;
;; d12 = 20 us
;; d13 = 4 us

1 ze
2 d1
  d12 t12
  p18 ph29
  d13
  d12 t10
  p1 ph0
  d2
  p2 ph1
  d3
  p3 ph2
  d3
  go=2 ph31
  wr #0
exit

ph0 = 0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph1 = 2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0 1 1 1 1
ph2 = 0 1 2 3 1 2 3 0 2 3 0 1 3 0 1 2
ph29 = 0
ph31 = 0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1

;--OUTPUT POWERS-----
;
;t10: transmitter high power level (0db)
;t12: transmitter low power level (50db) for presat
;
;--DELAYS-----
;
;d1 : relaxation delay (3-5 times T1*)
;d2 : delay to select max irradiation point, symmetrical
;     with respect to O1
;d3 : short delay
;d12: short delay to change power (20us)

```

```
;d13: short delay to allow for recovery (3us)
;
;--PULSES-----
;
;p1 : 90deg pulse
;p2 : 90deg pulse (finely adjust to optimize null excit-
; ation at O1
;p3 : 180deg pulse
;p18: presaturation pulse (ie 1.5sec)
;
;--ACQUISITION COMMENTS-----
;
; set O1 on resonance with the frequency where null excit-
; tation is desired. The pulse sequence results in a sin
; excitation profile, with opposite signs at each side of
; O1, at a distance (in Hz) of
;
; d = 1/(4*d2)
;
;--PROCESSING COMMENTS-----
;
; hence, when phasing the spectrum beware that ie peaks
; upfield of O1 will be positive and peaks downfield from
; O1 will look negative
;
;-----
```

### A.3 Programa de polsos dels experiments monodimensionals de <sup>13</sup>C-RMN

```
;zpgp30
;arx-version
;1D sequence for X-nucleus with power-gated H-1 decoupling
;using 30 degree flip angle
;;d11=30m
;;d12=20u
1 ze
2 d12 d16
  d1 cpd
  d11 d15
  p1*0.33 ph1
  go=2 ph31
  wr #0
  d11 do
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;t10: transmitter power level (default)
;d15: decoupler power level for CPD/BB decoupling
;d16: decoupler power level for decoupling to maintain NOE
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;p31: 90 degree pulse for slave timer (cpd-sequence)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;cpd: cpd-decoupling according to sequence defined by cpdprg
```

## A.4 Programa de polsos dels experiments $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY

```

;cosygr
;arx-version
;2D homonuclear shift correlation
;for gradients using homospoil pulse

#include <ARX.incl>

d0=3u
d13=4u

1 ze
2 d1
3 p1 ph1
  d0
  50u UNBLKGRAD
  p16:h
  d16
  p0 ph2
  d13
  p16:h
  d16
  4u BLKGRAD
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 zd
  lo to 3 times td1
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 2 2
ph31=0 2

;t10: transmitter high power level (default)
;p0 : 20 to 90 degree transmitter high power pulse
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 4 * n
;DS: 2 or 4

```

```
;td1: number of experiments  
;MC2: QF  
  
;use gradient ratio 1 : 1
```

## A.5 Programa de polsos dels experiments $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMQC

```

;inv4gs
;arx-version
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;with decoupling during acquisition
;for shaped gradients using gradient waveform memory
;use pulseprogram 'inv4gsnd1d' for setup

;ARX.incl - include file for ARX
;
;version 94/10/12

d27=p16/l21-2u

;;p2=p1*2
;;d0=3u
;;d2=1s/(cnst2*2)
;;d12=20u
;;d13=4u

d20=d2-p16
;d27=p16/l21-2u

1 ze
2 d1 do
3 p1 ph1
  d2 d10 setf2^3|9
  p3:d ph3
  d0

      11 2u:ngrad
      d27
          lo to 11 times l21
          2u:ngrad
d16
p2 ph2
d13

      12 2u:ngrad
      d27
          lo to 12 times l21
          2u:ngrad
d16
d0

```

```

p3:d ph4
d13

      13 2u:ngrad
d27

      lo to 13 times l21
      2u:ngrad

d20
d12 d15 setf2|3^9
go=2 ph31 cpd
d1 do wr #0 if #0 id0 zd
lo to 3 times td1
exit

ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph31=0 2 2 0

;tl0: transmitter high power level (default)
;d10: decoupler high power level (default)
;d15: decoupler power level for CPD/BB decoupling
;p1 : 90 degree transmitter high power pulse
;p2 : 180 degree transmitter high power pulse
;p3 : 90 degree decoupler high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p31: 90 degree pulse for slave timer (cpd-sequence)
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay (e.g. to compensate delay line) [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: d2 - p16 , but >= d16
;d27: delay for shaped gradient
;L21: loop for shaped gradients
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 1 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: QF
;cpd: cpd-decoupling according to sequence defined by cpdprg

;use gradient ratio 5 : 3 : 4

```





# Articles

A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth.

MariaRosa Quintero, Miquel E. Cabañas, Carles Arús

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids

Volume 1771, Issue 1 , January 2007, Pages 31-44

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL  
&\\_udi=B6VNN-4M6XMJ0-1&\\_user=1517286&\\_coverDate=01\%2F31\%2F2007  
&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000053449  
&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=1517286&md5=  
238f4f6076dc6fe5f35f9403680730d9](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VNN-4M6XMJ0-1&_user=1517286&_coverDate=01\%2F31\%2F2007&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000053449&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1517286&md5=238f4f6076dc6fe5f35f9403680730d9)