

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
*PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA*

ALINE BOHNENBERGER DE AGUIRRES

**Estudo das rotas de síntese dos gangliosídios nos dois
fenótipos da célula estrelada hepática**

Porto Alegre, 2005.

Aline Bohnenberger de Aguirres

**Estudo das rotas de síntese dos gangliosídios nos dois
fenótipos da célula estrelada hepática**

Orientadora: Prof^a. Dra. Vera Maria Treis Trindade

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Fátima T. C. R. Guma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas-Bioquímica como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, 2005.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me capacitado a chegar ao final deste trabalho.

À professora Vera, que nestes anos sempre demonstrou muita paciência, dedicação, empenho, conhecimento científico e ética. Agradeço a sua orientação, seu apoio e sua amizade.

À professora Fátima, pelos ensinamentos, incentivo e dedicação.

Às colegas do laboratório 21 e 25 que sempre mantinham prontos os materiais que necessitava para a realização deste trabalho.

À Paola, bolsista de iniciação-científica, pela sua prontidão, participação, ajuda e colaboração indispensável para a realização dos experimentos.

À Cléia, funcionária do PPGCB-Bioquímica, pela sua presteza nas informações administrativas necessárias para a realização do programa de mestrado.

À Senhora Lia e ao Senhor Waldemar, funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo auxílio na manutenção da sala de cultura e dos equipamentos usados nesta dissertação.

Ao CNPq, FAPERGS e PROPESP-UFRGS pelo auxílio financeiro a este projeto.

Ao meu marido, Daniel, pelo seu apoio, compreensão e por ter suportado os momentos difíceis da minha ausência em casa.

Aos meus pais, por terem proporcionado a minha formação, pelo estímulo e carinho dispensados.

RESUMO

Glicosfingolípídios (GSL) são constituintes da membrana plasmática e possuem bases de cadeia longa (bases esfingóides) como componente estrutural lipídico. Açúcares podem ser adicionados à ceramida sintetizada *de novo* (rota 1), sintetizada pela reciclagem da *esfingosina* (rota 2) e em GSL reciclados através do *Golgi* (rota 3). A serina palmitoiltransferase (SPT) é a enzima marca-passo e catalisa o primeiro passo na biossíntese *de novo* destes componentes. A linhagem celular GRX, representativa das células estreladas hepáticas, expressa o fenótipo miofibroblástico e pode ser induzida *in vitro* a adquirir o fenótipo lipocítico. Ambos fenótipos possuem gangliosídios da série-a (GM2, GM1 e GD1a) bem como o seu precursor GM3, que são expressos como *doublets* em HPTLC (bandas 1 e 2, respectivamente). Para o estudo da biossíntese dos GSL neste modelo biológico, foram determinadas as condições ideais para a atividade da SPT, e foi avaliada sua atividade na fração microsomal nos dois fenótipos. Também foi determinada a contribuição de cada rota de biossíntese para as duplas bandas. As células foram pré-incubadas com 5mM de β -cloroalanina (inibidor da SPT) ou com 25 μ M de fumonisina B1 (inibidor da ceramida sintase) e então, [U-¹⁴C]galactose foi adicionada no meio de cultura na presença contínua dos inibidores. Culturas controles (sem inibidores) foram realizadas simultaneamente. Os lipídios foram extraídos, os gangliosídios purificados em colunas Sep-Pack C18 e analisados por HPTLC, a qual foi revelada por auto-radiografia e após, submetida à análise densitométrica. Em ambos fenótipos, a síntese *de novo*, a reciclagem da *esfingosina* e a reciclagem pelo *Golgi* contribuem com a biossíntese dos GSL. No miofibroblasto, os *doublets* dos gangliosídios complexos (GD1a e GM1) são, principalmente, sintetizados pelas rotas de reciclagem; enquanto as bandas do GM2 e do GM3 têm uma participação importante da síntese *de novo*. No lipócito, as rotas de reciclagem são as mais importantes. Contudo, no lipócito, ambas bandas do GM2 e a banda 2 do GM3 apresentam considerável síntese pela rota *de novo*. Esta rota tem uma contribuição menor no lipócito do que no miofibroblasto, o que está de acordo com os níveis da atividade da SPT detectados nestes fenótipos. Isto sugere que os fenótipos miofibroblasto e lipócito utilizam *pools* de ceramida distintos para a síntese de seus GSL e que apresentam importantes diferenças entre as rotas biossintéticas, o que pode se refletir no seu comportamento celular.

ABSTRACT

Glycosphingolipids (GSL) are components of the plasma membranes and have long chain bases as lipid backbone. Sugars can be added to ceramide synthesized *de novo* (pathway 1), synthesized by *sphingosine* recycling (pathway 2) and into GSL recycling through the Golgi (pathway 3). Serine palmitoyltransferase (SPT) is the key enzyme and catalyzes the first step in the biosynthesis *de novo* of these components. GRX cell line, derived from murine liver connective tissue cells, expresses the myofibroblast phenotype and it can be induced *in vitro* to display the fat-storing phenotype (lipocyte). Both phenotypes showed gangliosides of the a-series (GM2, GM1 and GD1a) as well as their precursor GM3 and they were expressed as doublets in HPTLC (bands 1 and 2, respectively). For the study of sphingolipids biosynthesis in this biological model, we determined the ideal conditions for SPT activity and evaluated its activity in the microsomal fraction of both phenotypes. Also it was determined the contribution of the 3 biosynthetic pathways to the doublet gangliosides. Cells were preincubated with 5mM β -chloroalanine (inhibitor of SPT) or with 25 μ M fumonisin B1 (inhibitor of ceramide synthase) and then radiolabeled with [U-¹⁴C]galactose, with the addition of this precursor to culture medium, in continued presence of inhibitors. Control cultures (without inhibitors) of GRX phenotypes were simultaneously carried out. Lipids were extracted, gangliosides purified by Sep-Pack C18 cartridges and analyzed by HPTLC, which was revealed by autoradiography and submitted to densitometry. In both phenotypes *de novo* synthesis, sphingosine and Golgi recyclings contributed with GSL biosynthesis. In myofibroblast, complex gangliosides (GD1a and GM1) doublets are mainly synthesized by recycling pathways; while GM2 and GM3 bands have important biosynthetic participation of *de novo* pathway. In lipocyte, recycling pathways are the major biosynthetic routes. However, in lipocyte, both bands of GM2 and band 2 of GM3 have appreciable biosynthesis by *de novo* pathway. This route has a minor contribution in lipocyte than in myofibroblast that is in agreement with the level of SPT activity detected in both phenotypes. It suggests that myofibroblast and lipocyte phenotypes use distinct ceramide pools for their GSL synthesis and present important differences between biosynthetic pathways that could reflect their cellular behavior.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura I.1. Estrutura de um lóbulo hepático	2
Figura I.2. As mudanças fenotípicas das células estreladas hepáticas	4
Figura I.3. Classificação dos esfingolipídios	13
Figura I.4. Estrutura química de alguns esfingolipídios	14
Figura I.5. Rota de biossíntese dos esfingolipídios	15
Figura I.6. Vista esquemática da rota biossintética dos gangliosídios complexos	17
Figura I.7. Esquema da rota de degradação dos gangliosídios	19
Figura I.8. Modelo para a degradação lisossomal dos GSLs da ligados à membrana por exohidrolases lisossomais solúveis em água e proteínas ativadoras de membrana	20
Figura I.9. Esquema dos sítios sub-celulares do metabolismo e do tráfego dos gangliosídios	23
Figura I.10. Estruturas dos inibidores da biossíntese dos esfingolipídios	28
Figura IV.1. Efeito da variação da quantidade de proteína sobre a atividade da SPT	38
Figura IV.2. Efeito do tempo de incubação na atividade da serina palmitoiltransferase	38
Figura IV.3. Atividade da SPT em função da concentração de serina	40
Figura IV.4. Atividade da SPT em função da concentração de palmitoil-CoA	40
Figura IV.5. Auto-radiografia do produto da atividade da SPT	41
Figura IV.6. Minuta do artigo: Figure 1. Schematic representation of the proposed pathways for biosynthesis and recycling of gangliosides	61
Figura IV.7. Minuta do artigo: Figure 2. SPT activity in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes	62

Figura IV.8. Minuta do artigo: Figure 3. High performance thin layer-autoradiography of D- [¹⁴ C]-galactose labeled endogenous glycosphingolipids from GRX cell line expressing the myofibroblast (M) or the lipocyte phenotype (L)	63
Figura IV.9. Minuta do artigo: Figure 4. Radioactivity incorporation into b1 and b2 gangliosides of myofibroblast (mio) and lipocyte (lipo) in the three biosynthesis pathways	64
Tabela IV.1. Minuta do artigo: Table 1. Glycophingolipids distribution in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes treated with Fumonisin-B1 or β-Chloroalanine	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-KDS: 3-ceto-esfinganina ou 3-ceto-dihidro-esfingosina
- ARAT: acil-CoA:retinol aciltransferase
- BSA: albumina sérica bovina
- CMF-BSS: solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio
- CPM: contas por minuto
- CRBP: proteína celular ligante de retinol
- DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DTT: ditioneitol
- EC: células endoteliais
- ECM: matriz extracelular
- EDTA: ácido etileno diamino tetracético
- GEM: microdomínios membranosos enriquecidos com glicosfingolipídios
- Gg: gangliosídios
- GSL: glicosfingolipídios
- HEPES: ácido etanosulfônico-2-hidroxietilpiperazina
- HPTLC: cromatografia em camada delgada de alta performance
- HSC: célula estrelada hepática
- KC: célula de Kupffer
- LCB: gene codificador das bases de cadeia longa das sub-unidades da SPT

LRAT: lecitina:retinol aciltransferase

MYO: miofibroblasto

Neu5Ac: ácido N-acetilneuramínico

Neu-ase: neuraminidase ou sialidase

PBS: tampão fosfato-salina

PC: células parenquimais

POP: 2,5-difeniloxazol

POPOP: 1,4-bis[2-(5-feniloxazonil)]benzeno

RE: retículo endoplasmático

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

S: sinusóides

SA: atividade específica

SAT: sialiltransferase

SFB: soro fetal bovino

SPT: serina palmitoiltransferase

TIMPs: inibidores de metaloproteinases

TLC: cromatografia em camada delgada

TMD: domínio transmembrana

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. O fígado	1
I.2. As células estreladas hepáticas	3
I.2.1. Funções das células estreladas hepáticas	5
I.3. Fibrose e cirrose hepática	6
I.4. Linhagem celular GRX	7
I.5. Esfingolipídios	11
I.5.1. Conceito	11
I.5.2. Classificação	12
I.5.3. Biossíntese de novo dos esfingolipídios	14
I.5.4. Degradação dos esfingolipídios	18
I.5.5. Eventos metabólicos na membrana plasmática	20
I.5.6. Processos de glicosilação direta	21
I.5.7. Rota de salvação	21
I.5.8. Reciclagem (sem modificações metabólicas)	22
I.5.9. Serina palmitoiltransferase	23
I.5.9.1 <u>Caracterização</u>	23
I.5.9.2. <u>Genes codificadores da SPT</u>	25
I.5.9.3. <u>Atividade da SPT em diversos tecidos</u>	25
I.5.9.4. <u>Regulação da atividade da SPT</u>	26

I.5.10. Inibidores da biossíntese de esfingolipídios	27
1.6. Linhagem GRX e esfingolipídios	29
II. HIPÓTESE DE TRABALHO	30
II.1. Objetivos	30
III. MATERIAIS E MÉTODOS	31
III.1. Materiais	31
III.2. Cultura da linhagem GRX	31
III.2.1. Manutenção da cultura	31
III.2.2. Indução do fenótipo lipocítico	32
III.3. Avaliação da atividade da SPT	32
III.3.1. Obtenção da fração microssomal	32
III.3.2. Sistema de incubação para verificar a atividade da SPT	33
III.3.3. Processamento após incubação	33
III.3.4. Identificação do produto da reação	34
III.4. Avaliação das vias de síntese <i>de novo</i>, de reciclagem da <i>esfingosina</i> e reciclagem através do <i>Golgi</i>	34
III.4.1. Avaliação dos glicoesfingolipídios na presença de inibidores biossintéticos	34
III.4.2. Isolamento e análise dos glicoesfingolipídios celulares	35
III.4.3. Estimativa da incorporação radioativa nos glicoesfingolipídios em cada uma das três rotas biossintéticas	36
IV. RESULTADOS	37
IV.1. Determinação das condições adequadas para a avaliação da atividade da SPT.....	37

IV.1.1. Efeito da variação da quantidade de proteína sobre a atividade da SPT	37
IV.1.2. Efeito da variação do tempo de incubação sobre a atividade da SPT	37
IV.1.3. Efeito da variação da concentração de serina sobre a atividade da SPT	39
IV.1.4. Efeito da variação da concentração de palmitoil-CoA sobre a atividade da SPT	39
IV.1.5. Identificação do produto de reação da SPT	41
IV.2. Minuta do trabalho científico a ser submetido no periódico <i>Experimental Cell</i>	
<i>Research</i>	42
V. DISCUSSÃO GERAL	68
VI. CONCLUSÕES	73
VII. REFERÊNCIAS	75
VIII. ANEXO - Normas da revista: <i>Experimental Cell Research</i>	86

I. INTRODUÇÃO

I.1. O fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e tem como função principal metabolizar nutrientes e vitaminas, servindo como um intermediário entre a energia proveniente de fontes dietéticas e os tecidos extra-hepáticos que utilizam essa energia. Além disso, ele também participa na detoxificação e eliminação de drogas e toxinas xenobióticas, assim como de metabólitos endógenos (CHANG, et al., 1996). Esse órgão encontra-se situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Recebe a maior parte do seu sangue ($\pm 70\%$) da veia porta e uma porção menor através da artéria hepática. Pela veia porta chega ao fígado todo o material absorvido nos intestinos. Graças a essa característica, o órgão está em posição privilegiada para metabolizar e acumular nutrientes e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas absorvidas. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas (hepatócitos), as quais possuem entre outras funções: síntese protéica, secreção da bile, acúmulo de lipídios e glicídios, gliconeogênese e desintoxificação. Essas células se agrupam em placas que se anastomosam entre si, formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 – 2,0 mm de tamanho. Na espécie humana, os vários lóbulos se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão, em algumas regiões, entretanto, os lóbulos ficam separados por vasos e tecido conjuntivo. Essas são as regiões que ocupam os cantos dos poliedros, as quais se chamam espaço porta (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

No lóbulo, os hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente, sendo que cada placa é constituída por células dispostas em uma só camada. Essas placas celulares são perfuradas e freqüentemente anastomosam-se resultando em um labirinto complexo, que dá ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso. O espaço que fica entre as placas é ocupado por capilares chamados sinusóides hepáticos. Nos sinusóides desembocam ramos capilares terminais da artéria

hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os sinusóides hepáticos por sua vez desembocam na veia centrolobular. Entre o capilar sinusóide e os hepatócitos encontra-se um estreito espaço chamado espaço de Disse (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Além dos hepatócitos, o fígado é constituído por quatro tipos de células não-parenquimais: células de Kupffer ou macrófagos hepáticos, que fagocitam células mortas, restos celulares e microorganismos trazidos pelo sangue portal do intestino; células endoteliais que delimitam os sinusóides e são fenestradas para permitir a permeação macromolecular; células pit, com atividade de células exterminadoras naturais hepáticas, que agem contra infecções virais e as células estreladas hepáticas (CHANG et al., 1996). (Figura I.1)

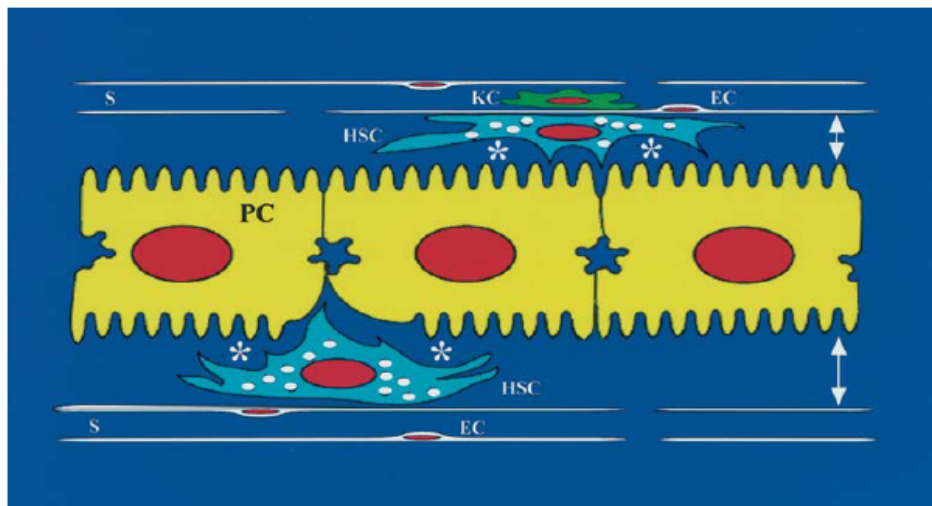


Figura I.1. Estrutura de um lóbulo hepático. As cordas hepáticas do lóbulo consistem de células parenquimais (PC). Células endoteliais (EC) do alinhamento fino dos sinusóides (S). Células de Kupffer (KC) são células que pertencem à linhagem de célula monócito-macrófago. Células estreladas (HSC) situam-se no espaço entre as células parenquimais e as células endoteliais e armazenam 80% dos retinóides do corpo inteiro como o palmitato de retinol em gotículas lipídicas no citoplasma. As setas indicam uma definição clássica do espaço peri-sinusoidal de Disse entre as células PCs e ECs; os asteriscos indicam um novo conceito de espaço peri-sinusoidal de Disse entre PCs e o complexo de HSCs e ECs (SENOO, 2004).

I.2. As células estreladas hepáticas

As células estreladas hepáticas (HSC), também chamadas de lipócitos, células armazenadoras de gordura, células de Ito ou células peri-sinusoidais (BRAESCO et al., 1995) são distribuídas quase homogeneamente através de diferentes zonas do lóbulo hepático e estão localizadas no espaço de Disse em contato com hepatócitos e células endoteliais (Figura I.1.) (CARLONI et al., 1996) e armazenam 80% dos retinóides de todo o corpo nas gotículas lipídicas do citoplasma, na forma de palmitato de retinol (SENOO, 2004). Morfologicamente elas consistem em um corpo celular e várias ramificações (processos), sendo que dois diferentes tipos de processos podem ser distinguidos: o processo peri-sinusoidal (subendotelial) e o processo inter-hepatocelular (inter-sinusoidal). No processo peri-sinusoidal as ramificações anteriores saem do corpo celular e direcionam-se ao longo dos sinusóides vizinhos, as ramificações secundárias circundam o tubo endotelial. Os processos inter-hepatocelulares, os quais são poucos, atravessam a placa celular hepática e direcionam-se aos sinusóides vizinhos. Tipicamente, uma célula estrelada enlaça dois ou mais sinusóides vizinhos (BLOMHOFF e WAKE, 1991). A ultra-estrutura das HSC mostra um complexo de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, sugerindo uma atividade de síntese protéica e secreção (NANNI, et al., 1997). Numerosas estruturas microtubulares estão presentes no citoplasma junto com feixes de microfilamentos, particularmente ao longo da superfície da matriz citoplasmática justaposta para as células sinusoidais endoteliais vizinhas. Análises ultraestruturais dos processos subendoteliais revelam que essas estruturas são equiparadas com numerosos filamentos semelhantes à actina, sugerindo que esses filamentos contribuam para reforçar o revestimento endotelial e/ou aumentar a eficiência das contrações dos capilares sinusoidais (PINZANI e GENTILINI, 1999.)

As HSC estão dispostas ao longo do sinusóide com uma distância entre núcleos de 40µm. Este distanciamento sugere que embora o número de HSC constitua uma pequena porcentagem do número total de células hepáticas (5-8%), sua disposição e extensão espacial talvez sejam suficientes para cobrir completamente a rede microcirculatória sinusoidal hepática (PINZANI e GENTILINI, 1999). Devido a essa orientação anatômica no compartimento sinusoidal, as HSC são consideradas análogas a pericitos microvasculares, regulando assim o fluxo sanguíneo sinusoidal (SUEMATSU et al., 1996; ROCKEY, 1997).

Uma característica das HSC é sua capacidade de expressar um duplo fenótipo. No fígado sadio, as células mostram um fenótipo quiescente (lipocítico) que contém gotas lipídicas ricas em vitamina A, organelas pouco desenvolvidas e uma baixa taxa de proliferação. No fígado lesado, como na fibrose e cirrose hepática, as células passam para um fenótipo “ativado”, diferenciando-se em células miofibroblásticas, com alta capacidade de proliferação, perda das gotas de gorduras que contém vitamina A e desenvolvimento de um proeminente retículo endoplasmático rugoso, microtúbulos extensos e feixes de filamentos de actina com condensações locais (Figura I.2) (HAUTEKEETE e GEERTS, 1997). As condições indutoras para a reversão do fenótipo miofibroblástico para o lipocítico implicariam na reversibilidade da fibrose hepática. (SENOO, 2004).

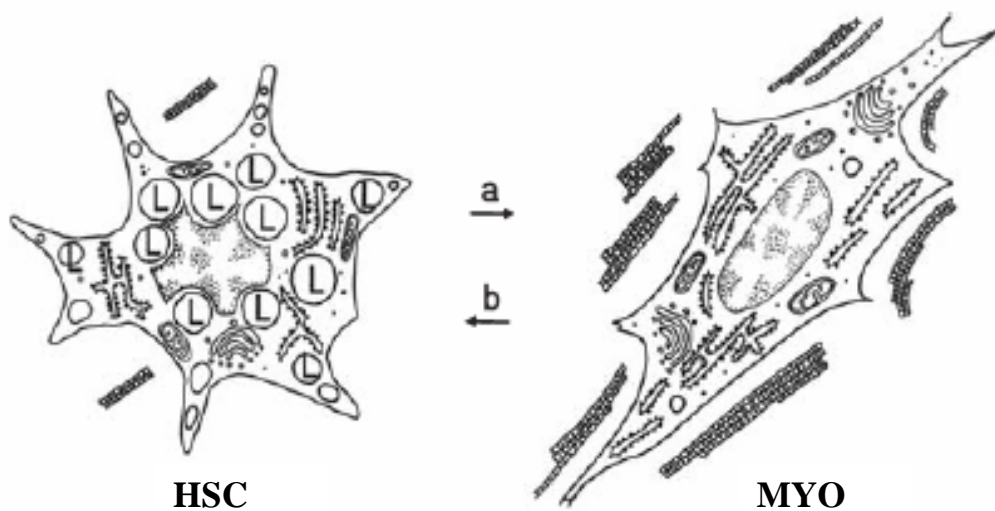


Figura I.2. As mudanças fenotípicas das células esteladas hepáticas. Em condições fisiológicas, as HSC armazenam 80% de retinóides do corpo inteiro nas gotículas lipídicas do citoplasma (L), na forma de palmitato de retinol, ao passo que em situações patológicas, como na cirrose hepática, essas células perdem retinóides, e sintetizam uma grande quantidade de componentes de matriz extracelular. A morfologia das células também muda do formato estrelado para o formato de fibroblasto ou miofibroblasto (MYO) (passagem *a*). As condições indutoras para passagem *b* implicam na reversibilidade da fibrose hepática. (SENOO, 2004).

I.2.1. Funções das células estreladas hepáticas

As HSC exercem funções hepáticas específicas como armazenamento de grandes quantidades de retinol, síntese e quebra de matriz extracelular hepática, secreção de uma variedade de citocinas e controle do diâmetro dos sinusóides (NIKI et al., 1999), regulando o fluxo sanguíneo (PINZANI e GENTILINI, 1999).

Está bem esclarecido que o armazenamento e metabolismo da vitamina A (retinol) é realizado principalmente pelo fígado (PINZANI e GENTILINI, 1999). Em torno de 50-80% do retinol total do organismo em circunstâncias normais é estocado no fígado, sendo que dois diferentes tipos celulares hepáticos são importantes nesse armazenamento: os hepatócitos e as HSC (BLANER e OLSON, 1994). As HSC são as armazenadoras de 80-90% do retinol hepático, sendo que 90% estão na forma de ésteres de retinol (BLOMHOFF e WAKE, 1991) e estes compõem 12% das gotas de gordura. O restante é composto de 50% de triacilgliceróis, 10% de ésteres de colesterol, 6% de ácidos graxos livres e 5% de fosfolípidios. Além, dos lipídios que representam 83% da composição, as gotas de gordura das HSC também contêm 14% de proteínas (YUMOTO et al., 1989).

As HSC possuem uma importante função na produção de componentes do tecido conectivo no fígado normal e em processos de fibrose e cirrose hepática. (WISSE et al., 1989). No fígado normal os componentes da matriz extracelular (ECM) equivalem a aproximadamente 0,5% do peso do fígado, sendo esta constituída tanto de componentes colagenosos como de componentes não colagenosos, que reforçam a arquitetura do espaço peri-sinusoidal, assegurando uma difusão ótima entre hepatócitos e a corrente circulatória. (PINZANNI e GENTILINI, 1999). As HSC também apresentam uma importante função de degradar a ECM, através da síntese e secreção de metaloproteinases. Estas células parecem regular a degradação de ECM em três níveis: ao transcricional, ao nível de ativação de enzimas latentes e por secreção de inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (HAUTEKEETE e GEERTS, 1997). O “turnover” normal dos ECM implica que a síntese dos novos componentes individuais está associada com sua degradação hepática lenta e contínua (PINZANNI e GENTILINI, 1999).

As HSC são uma das principais produtoras de citocinas que influenciam não somente na fibrogênese, mas também na inflamação, regeneração hepática, atividade de proteases, tônus

sinusoidal, migração celular e eritropoiese. As citocinas podem ser tanto inflamatórias e fibrinogênicas quanto podem reduzir estas respostas (FRIEDMAN, 1999).

Estudos sobre a hipertensão portal mostraram que o fluxo sinusoidal pode ser regulado pelas HSC, sendo que um grande número de agonistas da contração tem sido identificado, como endotelina-1, substância P, angiotensina II, noradrenalina, trombina (ROCKEY, 1997), adenosina e vasopressina (PINZANNI e GENTILINI, 1999).

I.3. Fibrose e cirrose hepática

A fibrose hepática e seu estágio final, a cirrose, são uma seqüela comum de doenças hepáticas inflamatórias crônicas, caracterizada por um aumento de 3 a 6 vezes de colágeno e de componentes não-colagenosos da matriz extracelular, ocorrendo uma deposição preferencial em torno da camada celular sinusoidal e do espaço de Disse e uma reorganização molecular de vários componentes de ECM, resultando em uma composição alterada da matriz fibrótica. Está bem estabelecido que as mudanças produzidas pela fibrogênese iniciam pela ocorrência de danos nas células parenquimais e com conseqüente inflamação (GRESSNER, 1998). Esses danos podem ser provocados por álcool, infecções virais e helmínticas persistentes e por uma sobrecarga congênita de metal (FRIEDMAN, 1993).

As HSC desempenham um papel essencial no desenvolvimento da fibrose hepática. No fígado normal as HSC têm um índice de proliferação baixo e produzem quantidades pequenas de ECM, mas as HSC de fígado com injúria crônica sofrem profundas alterações na morfologia e nas capacidades de síntese, transformando-se em células miofibroblásticas proliferativas, expressando um amplo espectro de moléculas de ECM. Estas células, assim chamadas HSC ativadas, são a maior fonte da ECM que se acumula no fígado fibrótico (ZHOU et al, 2004).

Essa ativação das HSC pode ser vista como um processo em dois estágios: iniciação (processo pré-inflamatório) e perpetuação. A iniciação refere-se a um começo de mudanças na expressão gênica e fenotípica em áreas injuriadas que ocasiona uma resposta celular a citocinas liberadas por células inflamatórias e outros estímulos, enquanto a perpetuação resulta desses

estímulos na manutenção do fenótipo ativado e na geração de fibrose (FRIEDMAN, 1999; GOLLA et al. 2004).

I.4. Linhagem celular GRX

A linhagem celular GRX foi estabelecida através da indução de granulomas fibróticos, em fígado de camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* (BOROJEVIC et al., 1985). Esta linhagem celular apresenta uma morfologia miofibroblástica e secreta *in vitro* uma complexa matriz extracelular. Ela tem características morfológicas e bioquímicas de culturas primárias de células do tecido conectivo hepático (MONTEIRO e BOROJEVIC, 1987a) e possui a capacidade de organizar a estrutura celular pré-existente de maneira análoga ao encontrado nessas culturas, assim como a encontrada em isolados de lesões hepáticas fibrogranulomatosas induzidas por infecção esquistossomal (MONTEIRO e BOROJEVIC, 1987b).

Em condições de cultura padrão, a GRX apresenta um fenótipo fibroblastóide alongado (Figura I.2.). Após atingir a hiperconfluência, exibe um típico padrão de “vales e montanhas”, característico de linhagens de músculo liso e miofibroblastos (MARGIS e BOROJEVIC, 1989), tendo pouca inibição por contato quando em confluência (BOROJEVIC et al., 1991).

A linhagem celular GRX pode ser induzida a adquirir o fenótipo lipocítico pelo tratamento com retinol, adquirindo um corpo poligonal mais regular e se espalhando no substrato, aumentando sua aderência a este, pois aumenta sua resistência ao desprendimento durante a tripsinização das células (BOROJEVIC et al., 1991). Após 24 horas de tratamento pequenos pontos pretos podem ser observados na área perinuclear, crescendo então para vacúolos esféricos e refringentes, ocupando a maior parte do volume celular, mas nunca se fusionando em um único vacúolo central (MARGIS e BOROJEVIC, 1989).

O padrão de síntese das proteínas de matriz extracelular é modificado ao longo da mudança fenotípica. A síntese de colágeno diminui durante a indução ao fenótipo lipocítico e a sua degradação corresponde a 15% do novo colágeno sintetizado, demonstrando um nível basal baixo para a síntese deste. No miofibroblasto, a síntese de colágeno é alta, mas a sua degradação corresponde a 60% do colágeno sintetizado (PINHEIRO e MARGIS et al., 1992). Esta

diminuição é específica para a síntese de colágeno, já que a síntese de proteínas totais não é modificada durante a conversão fenotípica, conseqüentemente a razão entre a secreção de colágeno e de proteínas totais apresenta-se diminuída no meio de cultura, sendo que a participação de colágeno entre as proteínas secretadas cai de 50% nos miofibroblastos para menos de 20% nos lipócitos. Essa síntese elevada de colágeno no miofibroblasto demonstra a relação desse fenótipo com o aumento da síntese de colágeno e talvez diretamente com o aumento da deposição deste durante a fibrose hepática (PINHEIRO e MARGIS et al., 1992). Simultaneamente, em acordo com o aumento da aderência celular dos lipócitos ao substrato, a secreção de fibronectina está aumentada em torno de 3 vezes nas células tratadas com retinol (BOROJEVIC et al., 1991).

Similarmente à síntese de proteínas, a síntese de glicosaminoglicanos é modificada durante a conversão lipocítica. Há uma diminuição de heparan sulfato pericelular, enquanto a condroitina sulfato permanece inalterada. Heparan sulfato também é conhecido, junto com a fibronectina, por mediar a adesão celular e a interação com a matriz extracelular. Eles também podem modular ativamente a proliferação celular através de interações com fatores de crescimento (BOROJEVIC et al., 1991).

O tratamento da linhagem celular GRX com retinol induz a reorganização ativa do citoesqueleto. As fibras de stress mais importantes são reduzidas em tamanho, e freqüentemente formam uma rede poligonal. Subseqüentemente, elas fragmentam-se e geram actina granular ou difusa na área perinuclear, uma fina camada contínua ao redor das gotículas lipídicas e, em lipócitos totalmente convertidos, surge uma camada periférica de finas fibras de actina. Alfa-actinina e tropomiosina estão presentes apenas nos lipócitos, co-distribuídas com actina numa forma granular. Então a indução do fenótipo lipocítico representa uma reprogramação total da expressão e função gênica. Pode-se considerar que ambos, lipócito e miofibroblasto, são “estados ativados” das HSCs, cada qual respondendo a modificações fisiológicas ou patológicas específicas das funções hepáticas (MERMELSTEIN et al., 2001).

Além disso, a indução fenotípica com retinol determina padrões diferentes para a síntese de colesterol, lipídios neutros e lipídios polares. A síntese de colesterol aumenta logo após a administração de retinol, enquanto que a síntese de fosfolipídios é pouco modificada, indicando que um caminho metabólico preexistente é ativado. Em contraste, há uma demora de quatro dias

no acúmulo de triglicerídios, pois a GRX não estoca triglicerídios na fase logarítmica de proliferação (MARGIS e BOROJEVIC, 1989).

Além da indução com o retinol, a insulina e a indometacina, também levam a uma mudança fenotípica. A indometacina tem efeitos similares aos do retinol, enquanto que a insulina não é capaz de induzir a síntese de lipídios, nem o acúmulo destes no meio de cultura, ao contrário do que ocorre na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, em que há uma regulação através da insulina (GUARAGNA et al., 1991). Entretanto a insulina e a indometacina têm, quando juntas, um forte efeito sinérgico, aumentando consideravelmente o acúmulo de lipídios totais (BOROJEVIC et al., 1991). Não se conhece ainda qual o mecanismo de ação da indometacina. Uma possibilidade é de que ocorra inibição da via da ciclooxigenase, diminuindo assim a síntese de prostaglandinas, conseqüentemente havendo um acúmulo de ácido araquidônico, que pode agir então, como um transdutor de sinal de membrana. A outra possibilidade é a de que exista um controle ao nível de expressão gênica, já que a diferenciação lipocítica pode ser induzida também por retinol (BOROJEVIC et al., 1990).

De acordo com essas observações, de que a indução do fenótipo lipocítico não está sob o controle da insulina, mas responde aos retinóides e a outras moléculas que modificam o programa de expressão gênica nessas células, Guaragna e colaboradores (1991) propuseram que as HSC não estão envolvidas no armazenamento de energia, mas que elas representam uma população celular particular, especializada no armazenamento e controle da homeostase de substâncias lipossolúveis, em que provavelmente a principal delas seja o retinol.

Observações mostraram que na conversão fenotípica da linhagem celular GRX, induzida através de retinol, há um aumento considerável na razão da captação celular deste e na sua conversão para ésteres de retinol. Acredita-se que ambas atividades sejam mediadas pela proteína celular ligante de retinol (CRBP) (MARGIS e BOROJEVIC, 1989). No mesmo estudo os autores também demonstraram que as células do tecido conectivo hepático são capazes, na ausência de hepatócitos, de incorporar e metabolizar retinol e responder da maneira específica, levando a mudança fenotípica. Mostrando que provavelmente os dois tipos celulares envolvidos no metabolismo hepático do retinol funcionem independentemente.

Vicente e colaboradores (1998) demonstraram que a CRBP-I responde a concentração extracelular de retinol e está relacionada à capacidade de ligação do mesmo no citosol das células

da linhagem GRX, e que sua expressão não está associada com a conversão completa do fenótipo lipocítico, induzida por outros agentes.

Na corrente sanguínea o retinol está associado, especificamente, à proteína ligadora de retinol (RBP). Fortuna e colaboradores (2003) demonstraram que os lipócitos, mas não os miofibroblastos expressam um receptor de membrana de alta afinidade para o complexo retinol-RBP, a captação de [³H] retinol do complexo holo-RBP foi inibida por excesso da holo ou da apo-RBP, mas não por soro albumina (BSA) ou heparina. Retinol livre também pode ser captado de maneira não específica. Estudos mostraram que as GRX captam e esterificam o retinol, independentemente deste ter sido oferecido à célula a partir de retinol livre ou do complexo retinol-RBP. Após a captação celular, o retinol do complexo holo-RBP é preferencialmente unido a componentes do citosol, esterificado e transferido para as gotas lipídicas. O retinol livre permanece principalmente associado aos componentes membranares.

A produção dos ésteres de retinol é dependente tanto da acil-CoA:retinol aciltransferase (ARAT) como da lecitina:retinol aciltransferase (LRAT). Os lipócitos têm uma capacidade de esterificação significativamente maior do que os miofibroblastos. Tanto a atividade da LRAT como a da ARAT, são induzidas durante a conversão do miofibroblasto para o lipócito. A indução pela LRAT é dependente do ácido retinóico, enquanto a indução pela ARAT é dependente da indução geral do fenótipo armazenador de gordura. A composição dos ácidos graxos dos ésteres de retinol sugere uma inclusão preferencial de ácidos graxos exógenos. Ambas, LRAT e ARAT participam na esterificação do retinol nas HSC: a atividade da LRAT está correlacionada com o status de vitamina A, enquanto que a ARAT depende da disponibilidade de acil-CoA graxo e do metabolismo lipídico geral. (FORTUNA et al., 2001).

Em outro estudo utilizando a linhagem celular GRX, Martucci e colaboradores (2004) demonstraram que o β -caroteno induz a conversão completa ao fenótipo lipocítico após dez dias. Este é diretamente convertido a ácido retinóico, o qual é encontrado no extrato total da célula e na fração nuclear, promovendo a conversão fenotípica. Com estas observações é proposto que as HSC são o local do fígado onde o β -caroteno é armazenado e liberado, podendo ser usado para a produção de ácido retinóico e para a manutenção da homeostase dos carotenóides circulantes em períodos de baixo consumo dietético.

Devido a todas as observações mencionadas, acredita-se que a linhagem celular GRX possa ser utilizada como um modelo *in vitro* das células estreladas hepáticas facilitando o estudo dos processos em que as mesmas estejam envolvidas como reação inflamatória e fibrose. Numa visão mais ampla, esta linhagem também pode ser útil na análise dos mecanismos moleculares envolvidos numa modulação fenotípica (BOROJEVIC et al., 1985; 1990; MARGIS e BOROJEVIC, 1989)

I.5. Esfingolipídios

Esfingolipídios são, tipicamente, encontrados em células eucarióticas, onde ocorrem, principalmente, na membrana plasmática e em organelas celulares cujo funcionamento esteja associado com a membrana plasmática, como o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi, os endossomos e os lisossomos. (MERRILL Jr. e JONES, 1990). Eles compreendem uma fração pequena (10-20%), mas vital da membrana lipídica. (HOLTHUIS et al., 2001), regulando a fluidez e as propriedades físico-químicas da membrana, e desempenhando um papel importante na interação, comunicação e migração das células (MERRILL et al., 1997).

I.5.1. Conceito

Esfingolipídios são compostos que contém na sua estrutura uma molécula do aminoálcool de cadeia longa, esfingosina ou esfingosinol (ou um de seus derivados = bases esfingóides). O grupamento amino da esfingosina pode estar unido a um ácido graxo de cadeia longa, através de uma ligação amida, formando a ceramida. A hidroxila primária da esfingosina pode fazer parte de uma ligação glicosídica ou de uma ligação fosfodiéster. A ceramida corresponde à unidade estrutural fundamental comum a todos esfingolipídios (HUWILER et al., 2000).

I.5.2. Classificação

Há três subclasses de esfingolipídios, todos derivados da ceramida, mas com diferentes substituintes na hidroxila primária: fosfoesfingolipídios (esfingomielina e inositolfosfoglicosfingolipídios), glicosfingolipídios neutros (sem carga) e glicosfingolipídios ácidos (gangliosídios e sulfatídios) (Figura I.3).

Os **fosfoesfingolipídios** apresentam um radical fosfato ligado à hidroxila primária da ceramida. Eles são divididos em esfingomielina e inositolfosfo-glicosfingolipídios. A esfingomielina possui um grupamento fosforilcolina ligado à hidroxila primária da ceramida (Figura I.3, Figura I.4). Esta substância está presente na membrana plasmática das células animais e, especialmente, na mielina, que é uma lâmina membranosa que envolve e isola os axônios de alguns neurônios. Os inositolfosfo-glicosfingolipídios possuem um grupamento fosfoinositol-açúcar ligado à ceramida (Figura I.3). Estes compostos estão presentes nos lipídios de membrana de fungos e protozoários (HANADA, 2003).

Glicosfingolipídios (GSL) são compostos que apresentam uma ou mais oses ligadas à hidroxila primária da ceramida. Podem ser classificados como neutros ou ácidos (Figura I.3).

Os GSL neutros são divididos em mono, di e oligo-glicosil-ceramidas conforme o número de resíduos de ose presente na molécula. Cerebrosídios contém um único resíduo de açúcar neutro ligado a ceramida; aqueles com galactose são caracteristicamente encontrados na membrana plasmática de tecidos neurais; e aqueles com glicose, na membrana plasmática de células em tecidos não-neurais. Globosídios são glicosfingolipídios neutros com três ou mais açúcares, sendo a seqüência das três primeiras oses formada por D-glicose, D-galactose e D-galactose (Figura I.3).

Os GSL ácidos são divididos em sulfatídios e gangliosídios (Figura I.3). Gangliosídios, são glicosfingolipídios mais complexos com unidades terminais de um ou mais resíduos de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), também chamado de ácido siálico. O ácido siálico dá aos gangliosídios a carga negativa em pH 7, uma das diferenças em relação aos globosídios. Gangliosídios com um resíduo de ácido siálico são denominados de GM (M para mono), aqueles com dois ácidos siálicos estão são chamados de GD (D para “di-”) e assim por diante (Figura I.3, Figura I.4).

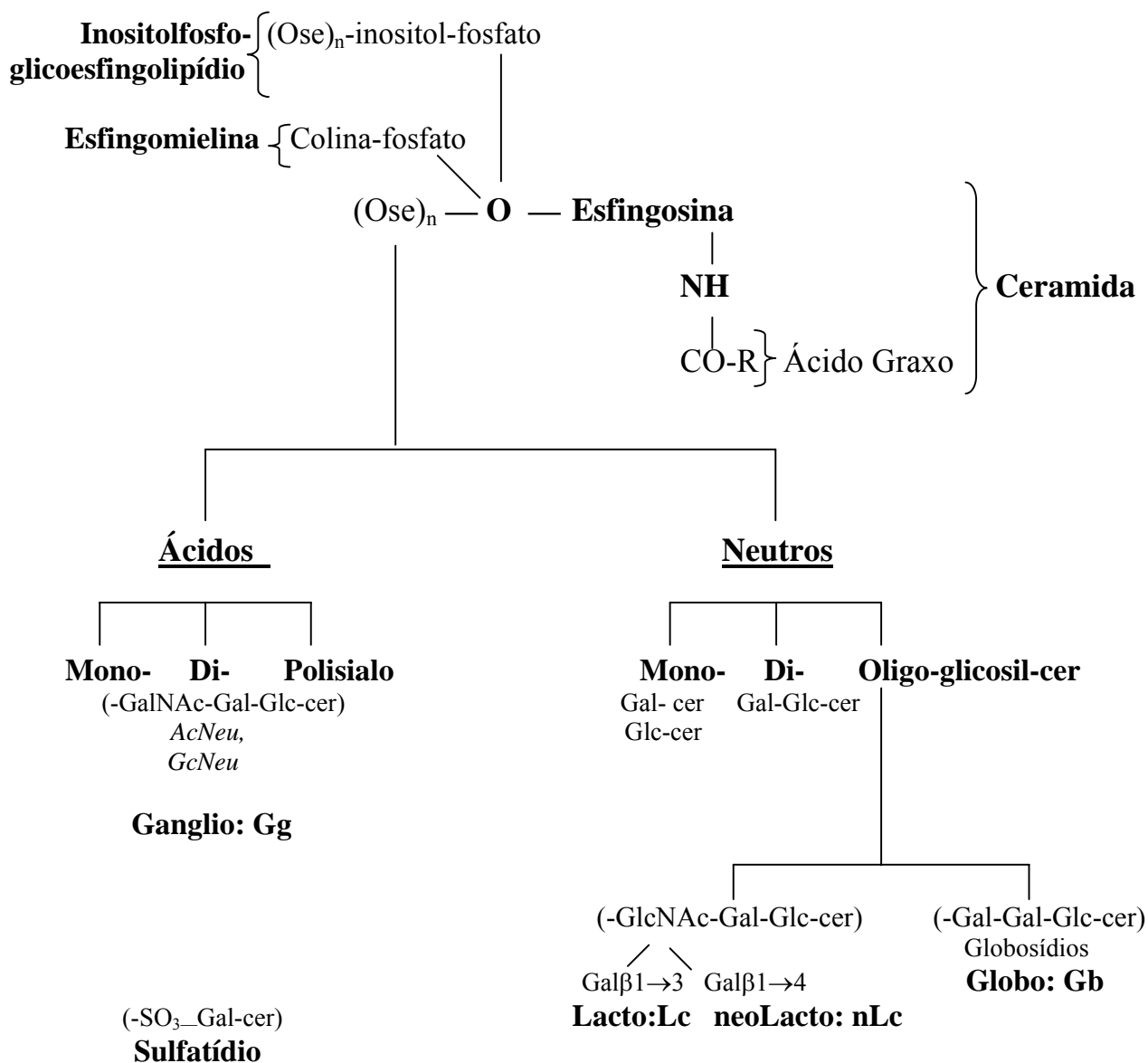


Figura I.3. Classificação dos esfingolipídios. Os gangliosídios podem ser da série Ganglio (Gg ou G), Lacto (Lc) ou neo-Lacto(nLc). (adaptado de BASU e BASU, 1982; SUNG et al., 1994).

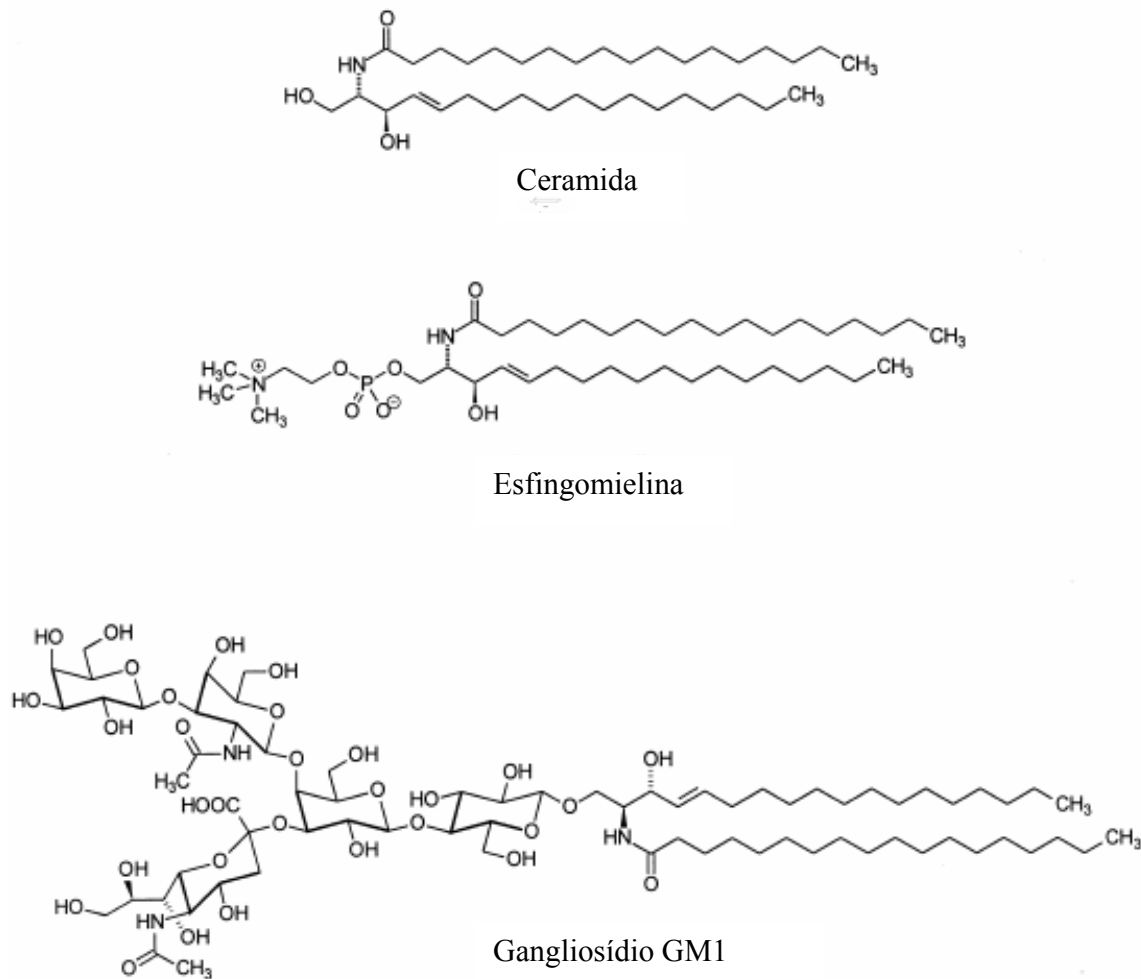


Figura I.4. Estrutura química de alguns esfingolipídios (adaptado de HANADA, 2003)

I.5.3. Biossíntese *de novo* dos esfingolipídios

A biossíntese dos esfingolipídios inicia com a combinação de palmitoil CoA e L-serina para formar 3-ceto-esfinganina ou 3-ceto-dihidro-esfingosina (3-KDS) e CO_2 , por ação da enzima serina palmitoiltransferase (E.C. 2.3.1.50) (SPT), uma enzima piridoxal 5'-fosfato dependente. (GILLARD, et al., 1998) (Figura I.5)

A SPT é a enzima chave para a regulação dos níveis de esfingolipídios na célula porque a modulação da síntese destes esfingolipídios no passo da SPT previne o acúmulo prejudicial de metabólitos intermediários incluindo bases esfingóides e ceramida, enquanto que a inibição em

outros passos anabólicos da rota de síntese dos esfingolipídios provoca o acúmulo de intermediários. (HANADA, K., 2003)

A 3-KDS, gerada pela ação da SPT, é imediatamente reduzida (pela ação da 3-ceto-esfinganina NAPH redutase) a esfinganina ou dihidro-esfingosina. Em células de mamíferos, a esfinganina é *N*-acilada (ocorre a adição de um ácido graxo por ação da esfinganina *N*-aciltransferase) para formar dihidro-ceramida, que é então dessaturada (introdução de uma ligação dupla no carbono 4, através da dihidroceramida desidrogenase) para formar ceramida. (MANDON, et al, 1992; HANADA, K., 2003). Todas estas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático e topologicamente orientadas para o lado citosólico (TETTAMANTI, 2004). (Figura I.5)

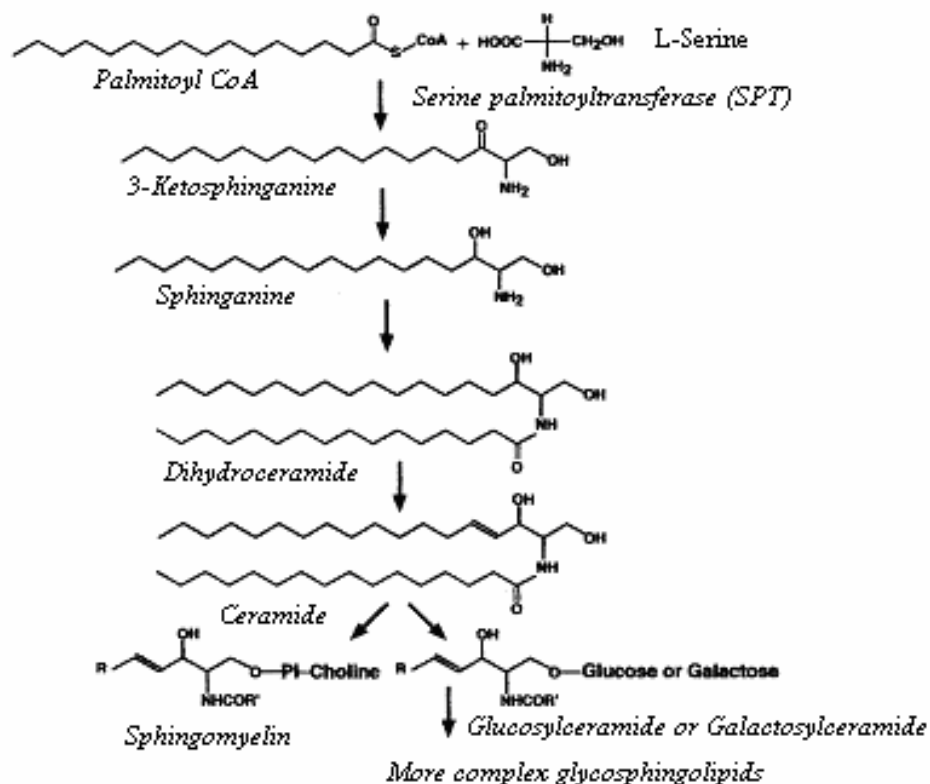


Figura I.5. Rota de biossíntese dos esfingolipídios. (adaptado de HANADA, 2003).

A ceramida é a base sobre a qual os esfingolípídios mais complexos são formados por adição de um grupo polar na posição 1: (a) fosforilcolina a partir da fosfatidilcolina, através da enzima esfingomielina sintase, formando a esfingomielina, e (b) glicídios para formar glicoesfingolípídios por adição de resíduos de oses e ácido siálico através de transferases (MERRILL Jr., 1991; HANNUN e LINARDIC, 1993).

O sítio intracelular da síntese de esfingomielina foi estudado em frações subcelulares de fígados de rato utilizando o precursor *D-erythro*-esfingosina marcada radioativamente. Ficou demonstrado que a síntese daquele composto ocorre, predominantemente, nas cisternas cis e medial do Golgi (FUTERMAN et al., 1990), assim como a síntese dos inositolfosfoglicoesfingolípídios (HOLTHUIS et al., 2001).

A literatura descreve para a biossíntese *de novo* dos gangliosídios que a ceramida recém formada se move do retículo endoplasmático para a cisterna do cis-Golgi, através de um mecanismo ainda desconhecido e é inserida na camada externa da membrana, voltada para o lado do citosol. A ceramida é glicosilada pela ação da glicosiltransferase. Esta glc-ceramida é então voltada para dentro do Golgi por ação de uma flippase ainda não caracterizada, onde as glicosilações seguintes ocorrem (TETTAMANTI, 2004). A primeira glicosilação catalisada pela lactosil-ceramida sintase é a galactosilação da glc-ceramida formando lac-ceramida (BASU et al., 1968; SUNDERMAN et al., 1992; NOMUROVA et al., 1998). A lac-ceramida é sialilada a GM3, GM3 a GD3 e GD3 a GT3, pela ação de três sialiltransferases (SAT I, SAT II e SAT III) cada uma reconhecendo especificamente o substrato acceptor (BASU et al., 1999; BASU et al., 2000; HUWILER et al., 2000; KOLTER et al., 2002). GM3, GD3 e GT3, são os pontos iniciais para a “série a”, série b” e “série c” dos gangliosídios, respectivamente (Figura I.6). Ao longo de cada série, as enzimas com especificidade relativa, N-acetil-galactosaminil transferase, galactosil transferase e sialil transferase (SAT IV) introduzem em seqüência um resíduo de N-acetilgalactosamina, galactose e ácido siálico, respectivamente, dando origem a gangliosídios mais complexos. Sialilações seguintes podem ser realizadas pela sialil transferase V (SAT V). A partir da lac-ceramida uma outra série de glicoesfingolípídios (“série O”) pode ser originada pela ação seqüencial da N-acetil-galactosaminil transferase, galactosil transferase, SAT IV e V, produzindo GA2 (asialo-GM2), GA1 (asialo-GM1) e os gangliosídios GM1b, GD1c e GD1α (TETTAMANTI, 2004). Há evidências substanciais para um gradiente de distribuição das glicosil transferases no complexo de Golgi (KEENAN et al., 1974), onde as glicosilações iniciais

prevalcem no cis/medial Golgi e, as glicosilações seguintes no trans Golgi/trans Golgi network (BASU et al., 1999; GIRAUDO et al., 1999; MACCIONI et al., 1999; BASU et al., 2000; DANIOTTI et al., 2000; KOLTER et al., 2002; MACCIONI et al., 2002). Isso implicaria num fluxo (possivelmente vesicular) dos intermediários de uma cisterna do Golgi para a cisterna seguinte. Os produtos finais da biossíntese dos gangliosídios deixam os sacos do Golgi ou do trans Golgi network, brotando em vesículas, alcançando e fusionando com a membrana plasmática. Para sustentar esta afirmação está o fato de que as cadeias sacarídicas dos gangliosídios construídas no lado luminal das membranas do Golgi, estão expostas no lado externo da membrana plasmática (MACCIONI et al., 2002; TETTAMANTI, 2004).

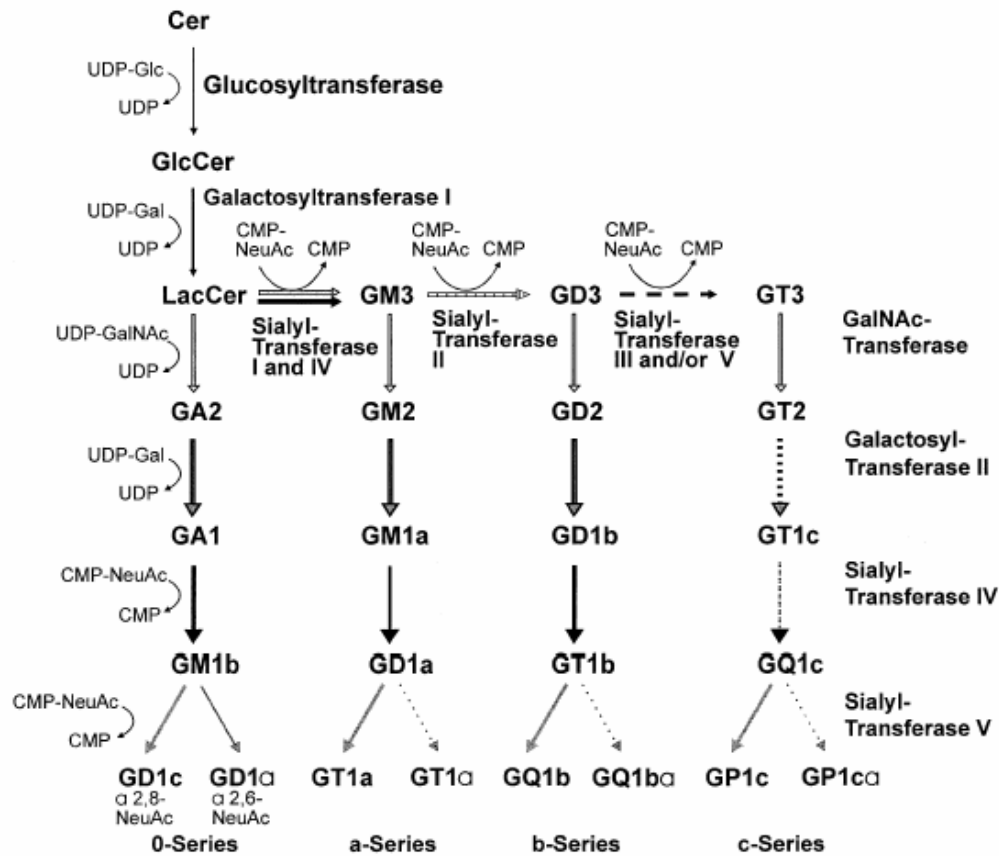


Figura I.6. Vista esquemática da rota biossintética dos gangliosídios complexos. Todos os passos das reações são catalizados por glicosiltransferases no lúmen do aparelho de Golgi. (HUWILLER et al., 2000)

I.5.4. Degradação dos esfingolipídios

Em relação a este processo, o catabolismo dos gangliosídios é o melhor estudado até o momento. Ele consiste na remoção individual e sequencial de resíduos de açúcar, iniciando pela unidade terminal não-reduzida, através de enzimas (exo)glicohidrolases. O fluxo de degradação ocorre através da rota endocitose-endossomos-lisossomos, e todos os passos enzimáticos do processo de degradação requerem um pH ácido dentro da organela. Esta condição é garantida pela ação de uma bomba de prótons que coloca íons H^+ dentro da organela (HUWILER et al., 2000; SANDHOFF, 2003; TETTAMANTI, 2004).

Primeiramente, os multi-sialogangliosídios são transformados pela sialidase I lisossomal nos seus mono-sialogangliosídios correspondentes, GM1 e GM2 (os quais são resistentes a esta enzima) ou a lac-ceramida (a partir do GM3). Seguindo a degradação a partir do GM1, galactose é então removida para produzir GM2, e do GM2 o resíduo de N-acetilgalactosamina é retirado para formar GM3, pela ação da β -galactosidase e da β -N-acetil-hexosaminidase, respectivamente. Em algumas células o ácido siálico é removido do GM1 e do GM2 pela sialidase II produzindo os asialiderivados correspondentes GA1 e GA2 e estes, pela ação da β -galactosidase e da β -N-acetil-hexosaminidase, respectivamente são convertidos em lac-ceramida (Figura I.7) (TETTAMANTI, 2004).

A enzima que catalisa a reação de quebra entre a glicose e a ceramida é chamada de “endoglicoceramidase” ou “ceramida glicanase” (BASU et al., 2000) e para ser ativada, necessita de proteínas ativadoras (SAP), aparentemente solúveis, cuja ação seria essencial in vivo (ITO et al., 1986) (Figura I.8). Finalmente, a ceramida pode ser hidrolisada produzindo esfingosina e ácido graxo por ação da ceramidase.

Também, foram descritas enzimas capazes de remover o ácido graxo de vários esfingolipídios (esfingomielina, gangliosídios e alguns glicoesfingolipídios neutros), produzindo os liso-derivados correspondentes (detectados somente em bactérias; não há evidências em vertebrados). Entretanto, se sabe que em pacientes com esfingolipidoses cerebrais há acumulação de liso-glicoesfingolipídios, semelhantemente aos produtos destas enzimas (HIRABAYASHI et al., 1988; FURUSATO et al., 2002; TETTAMANTI 2004).

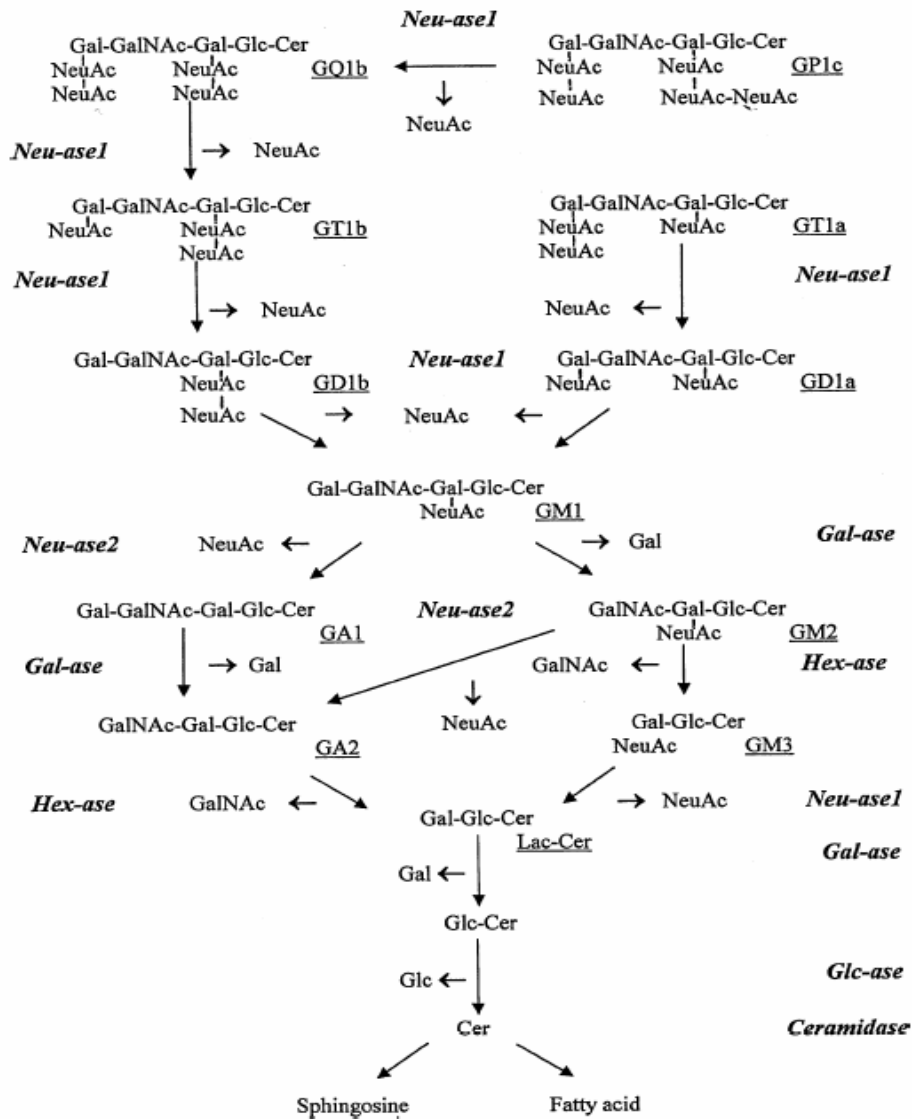


Figura I.7. Esquema da rota de degradação dos gangliosídeos. Neu-ase 1 (neuraminidase ou sialidase 1) e Neu-ase 2 (neuraminidase ou sialidase 2) são duas enzimas diferentes; Gal-ase (β -galactosidase); Hex-ase (β -hexosaminidase); Glc-ase (β -glucosidase). Os códigos dos nomes dos gangliosídeos estão de acordo com Svennerholm (1980) (TETTAMANTI, 2004).

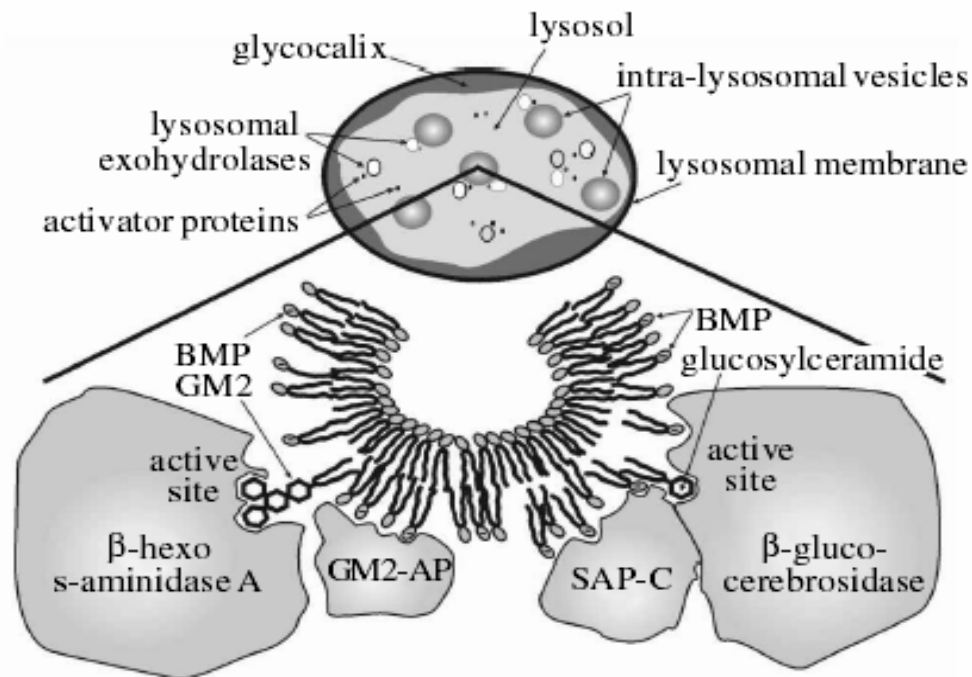


Figura I.8. Modelo para a degradação lisossomal dos GSLs ligados à membrana por exohidrolases lisossomais solúveis em água e proteínas ativadoras de membrana. São dados dois exemplos: degradação de GM2 por β -HEX A e GM2 AP; degradação de glicosil-ceramida pela β -glico-cerebrosidase e SAP-C (ou saposina C). O modelo enfatiza a topologia da degradação, as propriedades da estrutura da membrana intra-lisossomal, e as interações entre a superfície da membrana, proteína ativadora, enzima hidrolítica e substrato. (SANDHOFF e KOLTER, 2003)

I.5.5. Eventos metabólicos na membrana plasmática

Há evidências de que a membrana plasmática possui sistemas enzimáticos capazes de alterar o padrão de gangliosídios na própria superfície da célula. Glicoconjugados ligados na membrana plasmática são susceptíveis de serem glicosilados e deglicosilados *in situ*, pela ação de enzimas inseridas na mesma membrana ou pela aproximação da membrana do meio extracelular. Preti e colaboradores (1980), utilizando córtex de bezerra, descreveram uma sialiltransferase ancorada na membrana plasmática capaz de sialilar lac-ceramida a GM3 e GM1 a GD1a. A super-expressão de sialidasas da membrana plasmática em células COS7 parece ser seguida por uma mudança dramática no padrão dos gangliosídios, com um significativo decréscimo de GD1a e GD1b e aumento de GM1 e GM2, com aparente manutenção da viabilidade celular (MONTI et

al., 2003). De fato, a membrana plasmática tem várias sialidases que removem o ácido siálico de gangliosídios multi-sialosilados produzindo mono-sialo gangliosídios GM1 e GM2 ou lac-ceramida (TETTAMANTI, 2004).

I.5.6. Processos de glicosilação direta

Dados mostram que gangliosídios exógenos, internalizados por endocitose, podem alcançar o aparelho de Golgi, onde eles são glicosilados, e então devolvidos à membrana plasmática. O estudo de Riboni e colaboradores (1999) utilizando cloroquina, um inibidor da degradação lisossomal, demonstrou que GM1 radioativo administrado, exógenamente, a células de grânulos cerebelares, é transformado (embora em pequenas quantidades) em GD1a. Processo de glicosilação desta natureza pode ser visto como instrumento de remodelação da composição dos glicoesfingolipídios da membrana (TETTAMANTI, 2004). Por outro lado, Gillard e colaboradores (1996) incluem essas reações no processo de reciclagem através do *Golgi*.

I.5.7. Rota de salvação

Muitas evidências mostram que gangliosídios endocitados, pelo menos em parte, alcançam compartimentos sub-celulares (endossomos e lisossomos tardios) onde sua degradação ocorre. Dentro destas organelas, os produtos finais da degradação (monossacarídeos, bases de cadeia longa, ácidos graxos), bem como lac-ceramida, glc-ceramida e ceramida são formados. Todos ou alguns destes fragmentos deixam os lisossomos e entram no citosol, onde estão disponíveis para outros processos metabólicos, tanto de biossíntese ou de degradação. A saída destes produtos dos lisossomos ou endossomos pode ser através da difusão passiva, como no caso de bases de cadeia longa (RIBONI et al., 1998) ou por sistemas de transporte, como no caso do ácido siálico e outros sacarídeos ácidos (RENLUND et al., 1986; MANCINI et al., 1989, TETTAMANTI, 2004).

Estudos sub-celulares em fígados de ratos, aos quais foi administrado [³H-Sph]GM1, mostraram que após um curto período da administração (4h), os produtos da degradação do GM1 (GM2, GM3, lac-ceramida, glc-ceramida e ceramida) foram detectados na fração lisossomal, enquanto que os produtos da síntese *de salvação* usando esfingosina radioativa produzida no

processo de degradação (GM1, GD1a, GD1b, GT1b, e esfingomielina) foram observados mais tarde, na fração do aparelho de Golgi. Este comportamento reflete a seqüência temporal dos eventos: primeiro a degradação lisossomal com a produção de fragmentos utilizáveis e, então, a síntese de *salvação* destes fragmentos para propósitos biossintéticos no aparelho de Golgi e no retículo endoplasmático (TETTAMANTI et al., 1984). Esse processo foi denominado de reciclagem da *esfingosina*, por Gillard e colaboradores (1996).

I.5.8. Reciclagem (sem modificações metabólicas)

É estimado que metade da membrana plasmática é internalizada por hora. Em parte, ocorre um retorno direto de proteínas e componentes lipídicos sem modificações para a membrana e em parte por um processo paralelo de re-síntese e remodelamento dos constituintes da membrana, tanto de natureza lipídica quanto de protéica, a fim de manter uma composição, dinamicamente, constante da superfície da célula (TETTAMANTI, 2004). Sofer e colaboradores (1996) trabalhando com neurônios hipocâmpais polarizados e células de neuroblastomas N18TG-2 e utilizando um derivado de GM1 fluorescente, demonstraram que este era internalizado e, grande parte era reciclado para a membrana plasmática sem sofrer nenhum processo metabólico. Este mesmo processo também foi demonstrado por Kok e colaboradores (1989 e 1992) em células de rins de filhotes de hamsters.

Na figura I.9. pode-se visualizar os sítios subcelulares do metabolismo e do tráfego dos gangliosídeos de todos os processos descritos acima.

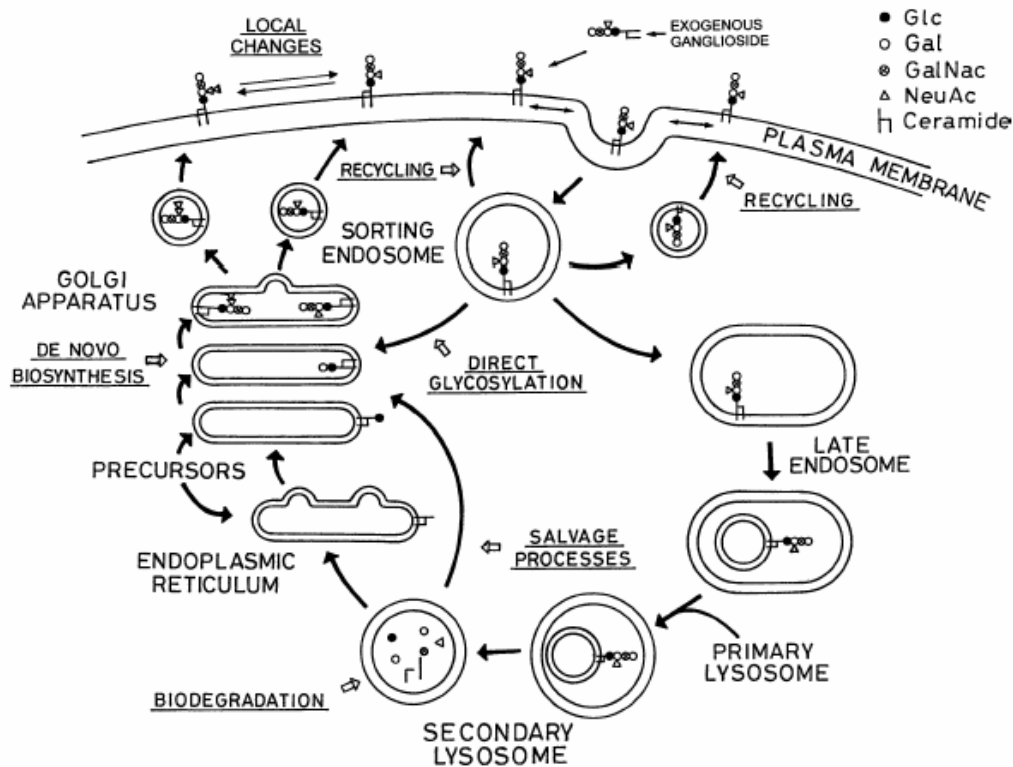


Figura I.9. Esquema dos sítios subcelulares do metabolismo e do tráfego dos gangliosídeos. Reciclagem da membrana plasmática sem modificações metabólicas; biossíntese de novo no RE e aparato de Golgi; glicosilação direta no aparato de Golgi; degradação nos late endossomos/lisossomos; rota de salvatagem no RE e aparato de Golgi; modificações locais na membrana plasmática (TETTAMANTI, 2004).

I.5.9. Serina Palmitoiltransferase (E.C.2.3.1.50)

I.5.9.1. Caracterização

A serina palmitoiltransferase é a enzima que catalisa a primeira reação na síntese dos esfingolipídios, condensando serina e palmitoil CoA e formando 3-ceto-dihidro-esfingosina (3-KDS) ou 3-cetoesfinganina. Esta etapa é considerada limitante da biossíntese dos esfingolipídios (Figura I.5).

A SPT foi, inicialmente, caracterizada em preparações utilizando o fungo *Hansenula ciferri* (BRAUN e SNELL, 1968) e cérebro de camundongos (BRAUN et al., 1970) onde se demonstrou que serina e palmitoil CoA eram substratos da reação, que a 3-KDS era o produto imediato e que piridoxal 5'-fosfato era requerido para a atividade enzimática. A SPT

parcialmente purificada a partir da bactéria *Bacterioides menalinogenicus* apresentou propriedades químicas similares (LEV e MILFORD, 1981).

Entre vários acil-CoAs, o palmitoil-CoA é o melhor substrato para a SPT de mamíferos *in vitro*. Pentadecanoil- e heptadecanoil-CoA também são efetivos, enquanto que miristoil- e esteaoril-, palmitoleoil- e araquidoil-CoA são bem menos efetivos. Em células de mamíferos o palmitoil-CoA é um dos tipos de acil-CoA mais abundante e por esta razão o comprimento das cadeias das bases esfingóides de mamíferos é, principalmente, composta por 18 átomos de carbono. A SPT utiliza entre os aminoácidos, estritamente, a L-serina como substrato. Todos os grupos, hidroxil, amino e carboxílico, deste aminoácido são responsáveis pelo seu reconhecimento pela enzima (HANADA, 2003).

Estudando a biossíntese *de novo* de esfinganina e esfingosina em células LM incubadas com [14C] serina, Merrill Jr. e Wang (1986), observaram que as bases esfingóides livres não foram detectadas (embora a formação de 3-KDS possa ser demonstrada *in vitro*). Assim, as propriedades cinéticas e a rápida formação de dihidroceramida e ceramida sem acúmulo de intermediários detectáveis, sugerem que o primeiro passo da biossíntese de esfingolipídios seja a reação limitante desta via.

Williams et al (1984) mostraram que a atividade da SPT reside na fração microsomal, a qual representa a mistura das vesículas derivadas de retículo endoplasmático liso e rugoso e também das cisternas de Golgi.

Em trabalho realizado em 1992, Mandon et al., usando preparações de Golgi e retículo endoplasmático altamente purificados de fígado de camundongo, confirmaram a localização da SPT no retículo endoplasmático. Esta enzima de atividade biossintética, não é latente, indicando que ela se apresenta no lado citosólico do RE, possibilitando livre acesso do substrato ao sítio ativo. Isto foi demonstrado, tratando-se as vesículas intactas do RE enriquecidas em atividade enzimática da SPT com proteases suaves de diferentes especificidades. A atividade da SPT foi reduzida em 50-80% e não houve diminuição da atividade da manose-6-fosfatase (proteína do lúmen do RE). Esta considerável perda da atividade enzimática sugere que a SPT continha resíduos de aminoácidos importantes, expostos na superfície citosólica das vesículas do RE.

I.5.9.2. Genes codificadores da SPT

Os genes da SPT foram isolados e seqüenciados, usando *Saccharomyces cerevisiae* deficiente em esfingolipídios. Nagiec et. al. (1994), demonstraram que a superprodução de esfingolipídios neste fungo requeria a expressão de *LCB1*, um gene previamente isolado do fungo, e de *LCB2*, um gene demonstrado neste trabalho e também necessário à atividade da SPT, sugerindo que ambos os genes codificavam subunidades desta enzima e que o aumento da atividade da SPT era obtido somente se ambos os genes *LCB* fossem expressos.

A *LCB1* e a *LCB2* de mamíferos codificam proteínas de 53- e 63-kDa, respectivamente. Estas subunidades têm identidade de aproximadamente 20%, e esta identidade é relevante para a formação de um heterodímero por estas duas subunidades (HANADA et. al., 1997; WEISS e STOFFEL, 1997). Tanto a *LCB1* como a *LCB2* possuem um grande domínio hidrofóbico, o qual representa um domínio transmembrana (TMD). Nenhuma das subunidades parece ser glicosilada. Análise imunocitoquímica indireta com epitopo-alvo *LCB1* indicou que o N e o C terminal da *LCB1* estão orientadas para o lúmen e o citosol, respectivamente do RE. Os dados obtidos sugerem fortemente que tanto a *LCB1* e *LCB2* são proteínas de membrana integrais tipo I, do RE (HANADA, 2003).

I.5.9.3. Atividade da SPT em diversos tecidos

Vários trabalhos (WILLIAMS et al, 1984; MERRILL et al., 1985; MANDON et al., 1991) caracterizaram a atividade da serina palmitoiltransferase em preparações de vários tecidos de mamíferos e linhagens de células em cultura (cultura de neurônios cerebelares de ratos). Nestes estudos foi observado que a atividade da enzima refletiu o conteúdo de esfingolipídios dos tecidos. Consistente com isto, Holleran et al., (1990), evidenciaram altos níveis de atividade enzimática da SPT em microsomas derivados de queratinócitos humanos, correspondendo ao elevado conteúdo de esfingolipídios no extrato córneo dos mamíferos.

Merrill Jr. et al (1985) trabalharam com microsomas derivados de diferentes tecidos de ratos (fígado, pulmão, cérebro, rim, intestino, baço, músculo, coração, testículos, ovários e estômago), no intuito de verificar se os diferentes tecidos eram capazes de iniciar a via metabólica dos esfingolipídios. Serina palmitoiltransferase foi encontrada em todos os tecidos e, a atividade esteve relacionada diretamente com os níveis de esfingomiélin.

A atividade da SPT foi determinada em diversos sistemas (tecidos animais, vegetais e microorganismos) utilizando-se diferentes ácidos graxos. A atividade enzimática foi, consistentemente, mais elevada com ácidos graxos saturados de 16 ± 1 átomos de carbono. Isto sugere que a predominância de bases de longas cadeias de 18 átomos de carbono in vivo é devida à maior atividade desta enzima com palmitoil CoA (WILLIAMS et al., 1984; MERRILL Jr et al., 1985; HOLLERMAN et al., 1990; LYNCH e FAIRFIELD, 1993).

A SPT foi, também, caracterizada em microssomas de fígado de ratos e se verificou que mais de 75% da atividade da enzima está associada com a fração microssomal, com a atividade enzimática dependente do tempo de incubação, do pH, de temperatura e de outros componentes do sistema de incubação: concentração de proteínas microssomais, substratos, ditioneitol, EDTA e piridoxal-5-fosfato (WILLIAMS et al., 1984).

Rotta e colaboradores (1999), estudando os efeitos da desnutrição pré e pós-natal sobre a síntese dos esfingolípídios do SNC, verificaram que a atividade específica da SPT foi menor em ratos hiponutridos, comprometendo a síntese *de novo* dos esfingolípídios, comprovando assim o fato de que a desnutrição protéica pré e pós-natal reduz a concentração de gangliosídios hipotalâmicos, devido a alterações no conteúdo dos precursores biossintéticos dos esfingolípídios.

I.5.9.4. Regulação da atividade da SPT

Consistente com a expressão dos esfingolípídios em todos os tipos de células de mamíferos, a atividade da SPT é detectada em muitos tipos de tecidos e preparações celulares como foi resumido na revisão de DICKSON e colaboradores (2000). Além disso, o RNAm para as subunidades do SPT é sempre expresso nos vários tecidos, apesar dos níveis de RNAm variarem dependendo do tipo de tecido (WEISS e STOFFEL, 1997; HANADA et al, 1997). Os níveis da atividade do SPT também variam entre os diferentes tipos de tecidos e células. Os níveis da atividade do SPT são significativamente maiores em microssomas de pulmão e de rim de ratos do que em microssomas de coração e de testículos (MERRILL Jr., ET AL., 1985), e os níveis de RNAm para as subunidades da SPT são maiores em pulmão e rim do que em coração e testículo de ratos (WEISS e STOFFEL, 1997; HANADA et al, 1997). Os níveis de atividade da SPT também dependem do estágio de desenvolvimento dos tecidos. Por exemplo, a atividade

SPT aumenta progressivamente desde o estágio fetal ao período neonatal, e alcança seu platô no estágio adulto no pulmão de ratos (LONGO et al., 1997). Além do mais, os níveis da atividade SPT em vários tecidos de animais são afetados pela dieta (ROTTA et al., 1999; GEELAN et al., 2000). Embora o metabolismo prioritário da regulação da atividade SPT seja amplamente desconhecido, estudos recentes começaram a fornecer algumas pistas dentro da regulação transcricional e pós-transcricional da atividade SPT.

Hanada (2003) relatou em sua revisão sobre a SPT que: a) os níveis de RNAm da subunidade *LCB* e a atividade da SPT aumentam em resposta a vários tipos de estímulos inflamatórios e de stress; b) a subunidade *LCB2* parece ser instável, a menos que ela esteja associada à subunidade *LCB1*; c) um suprimento externo de esfingolipídios diminui a síntese *de novo* em vários tipos celulares; d) os níveis de colesterol afetam a atividade da SPT diferentemente, dependendo do tipo celular; e) a taxa de síntese dos esfingolipídios em células intactas está correlacionada com as concentrações de serina e de ácido palmítico, mas não com outros tipos de ácido graxo no meio de cultura, sugerindo que a taxa da síntese *de novo* reflete os níveis citosólicos de serina e palmitoil-CoA.

I.5.10. Inibidores da biossíntese de esfingolipídios

Os inibidores da biossíntese de esfingolipídios têm sido usados para estudar as suas rotas de síntese e a sua localização subcelular. Uma estimativa da quantidade de glicídio incorporado nos GSL nas três rotas [síntese *de novo* (rota 1), *de salvação* ou reciclagem da *esfingosina* (rota 2) e reciclagem pelo *Golgi* (rota 3)] pode ser obtido pelo uso de dois inibidores da síntese dos esfingolipídios (β -cloroalanina, fumonisina B1). A β -cloroalanina inibe a enzima serina palmitoiltransferase, bloqueando a síntese de esfinganina e esfingosina (biossíntese *de novo*) e a fumonisina B1 inibe a acilação da esfinganina ou esfingosina para a formação de dihidroceramida ou ceramida (biossíntese *de salvação*) (GILLARD et al., 1998; MEDLOCK e MERRILL Jr., 1988; MERRILL et al, 1993a; MERRILL et al, 1993b; ZIULKOSKI, et al., 2001)

A β -cloroalanina é, estruturalmente, relacionada com a serina e inibe a SPT, irreversivelmente, bloqueando o grupo piridoxal-fosfato na enzima (Figura I.10) (HANADA et al., 2000; IKUSHIRO et al., 2004).

A fumonisina B1 é uma toxina produzida por fungos encontrada no milho e em outros grãos, e possui uma estrutura química similar às bases esfingóides de longas cadeias (van ECHTEN et al., 1990). Sua similaridade com bases esfingóides permite que ela seja reconhecida como substrato da ceramida sintase (Figura I.10) (MERRILL, 1994).

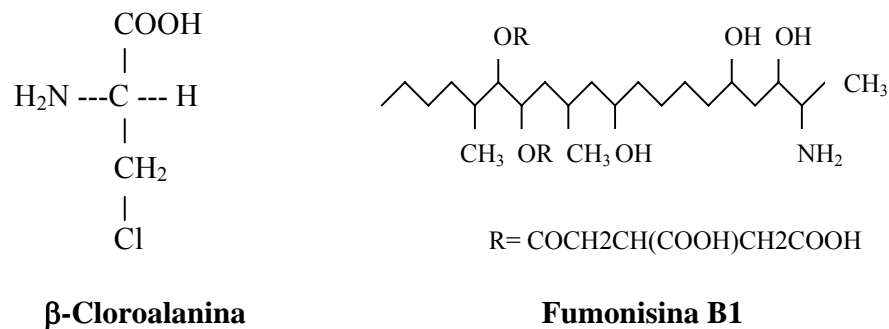


Figura I.10. Estruturas dos inibidores da biossíntese dos esfingolipídios.

Gillard e colaboradores (1996) observaram que as células SW13, uma linhagem celular de carcinoma adrenal humano, sintetizavam a maior parte dos seus GSL pela rota de salvação. Este mesmo grupo, em 1998, estudou a síntese dos GSL em outras quatro linhagens celulares. Foi reportado que aproximadamente 90% da incorporação de açúcar ocorre pela rota de salvação e que 10% ou menos pela síntese de novo em fibroblastos de prepúcio humano, em células de neuroblastoma NB41A3. Em contraste, aproximadamente 50-90% da incorporação de açúcar ocorre através da síntese de novo em mioblastos C2C12. Estas células se dividem mais, rapidamente, e sintetizam de 10-14 vezes mais GSL do que as outras três linhagens celulares. Nas células de glioma C6, 30% da incorporação de açúcar ocorreu pela síntese de novo e 60% pela reciclagem.

Em células de Sertoli de ratos, Ziulkoski e colaboradores (2001) também utilizando os inibidores da síntese dos GSL, β-cloroalanina e fumonisina B1, demonstraram que a esfingomielina 1 é sintetizada principalmente pela rota 1 e 2 (40 e 43% respectivamente), e que 61% da esfingomielina 2 é sintetizada pela rota 1 e 30% pela rota 3.

I.6. Linhagem celular GRX e glicosfingolipídios

O modelo experimental da linhagem celular GRX nos permite analisar e comparar diversos parâmetros do metabolismo das células estreladas hepáticas no fenótipo miofibroblástico versus lipocítico.

Os glicosfingolipídios são compostos envolvidos na diferenciação, na proliferação, crescimento e na adesão celulares, participam de fenômenos de sinalização celular e dos microdomínios membranosos enriquecidos em glicosfingolipídios (GEM) (LLOYD e FURUKAWA, 1998; HAKOMORI, 2003). Também, são conhecidas algumas alterações na composição de gangliosídios em transformações fenotípicas e neoplásicas (HAKOMORI, 1993).

No trabalho realizado por Andrade e colaboradores (2003) foi reportado o perfil dos esfingolipídios na linhagem celular GRX, tanto no fenótipo miofibroblástico como no lipocítico. Ambos os fenótipos apresentaram gangliosídios da *série a* (GM2, GM1 e GD1a), assim como o seu precursor GM3. Todos foram expressos em dupla banda na TLC, sendo que o fenótipo lipocítico se caracteriza por uma maior quantidade da banda constituída por ceramida com ácidos graxos de cadeia mais longa (C22 e C24). Os lipócitos, também, apresentaram o dobro do conteúdo total de gangliosídios e uma maior atividade da GM2 sintase (enzima reguladora da série “a” dos gangliosídios).

II. HIPÓTESE DE TRABALHO

A partir dos resultados de Andrade e colaboradores (2003), vemos que há diferenças quantitativas e qualitativas na expressão dos gangliosídeos nos dois fenótipos (miofibroblástico e lipocítico) da linhagem celular GRX, principalmente, em relação à composição em ácidos graxos da parte ceramida.

Considerando estes dados, trabalhamos sobre a hipótese de que estas diferenças pudessem ser decorrentes de distintas contribuições das rotas biossintéticas *de novo*, reciclagem da *esfingosina* e da reciclagem do aparelho de *Golgi*.

II.1. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- estudar as condições adequadas (tempo de incubação, quantidade de proteína, concentração dos substratos) para a medida da atividade da enzima marca-passo da biossíntese dos esfingolipídios (SPT) usando a fração microssomal de miofibroblastos da linhagem GRX;
- comparar as atividades desta enzima nos fenótipos miofibroblástico e lipocítico desta linhagem celular;
- avaliar a contribuição das rotas de síntese *de novo*, reciclagem da *esfingosina* e reciclagem do *Golgi* utilizando os inibidores enzimáticos β -cloroalanina (serina palmitoiltransferase) e fumonisina B1 (ceramida sintase);
- através da HPTLC, determinar se as duas bandas correspondentes aos glicosfingolipídios são sintetizadas pela mesma rota metabólica.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Materiais

D-[U-¹⁴C]galactose (285mCi/mmol), L-[U-¹⁴C]serina (54mCi/mmol) foram compradas da Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK). All-trans-retinol, indometacina, palmitoil coenzima A, piridoxal 5'-fosfato, Hepes, ditioneitol, EDTA, DL-eritrodihidroesfingosina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, glucosilceramida, lactosilceramida, GM3, GM2, GM1 e GD1a gangliosídeos, esfingomielina, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e filme radiográfico Kodak X-Omat AR foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Cromatofolhas de Silica-gel 60 (TLC e HPTLC) foram providas pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Colunas Sep-Pack C18 foram obtidas da Waters (Milford, MA, USA). Soro Fetal Bovino (SFB) foi comprado do Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Todos os outros produtos químicos e solventes utilizados foram de escala analítica.

III.2. Cultura da linhagem GRX

III.2.1. Manutenção da cultura

A linhagem celular GRX foi fornecida pelo do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). Os estoques da linhagem eram criopreservados em nitrogênio líquido a aproximadamente -200°C.

O meio de cultura utilizado foi o Eagle modificado por Dulbecco, que consiste em uma mistura de sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, glicose e vermelho de fenol.

Todos os materiais utilizados para a preparação da cultura (provetas, copos de Becker, pipetas Pasteur, filtros a vácuo e garrafas) eram lavados com Extran alcalino, enxaguados e submetidos a quatro passagens em água destilada e duas em água bidestilada em vidro. As

pipetas Pasteur, ponteiras, garrafas e gases eram autoclavados a 121°C e 1 atm de pressão, por 40 minutos e os filtros por, somente, 20 minutos.

A partir de garrafas de cultura-estoque, eram preparadas as culturas utilizadas nos experimentos. As células estoques eram lavadas três vezes com CMF-BSS, e a elas adicionadas cerca de 1ml de tripsina/EDTA e através de agitação mecânica, desprendiam-se as células da garrafa. A tripsina era inibida com quatro volumes de DMEM/ 3% de SFB e uma alíquota retirada para contagem das células em câmara de Neubauer. As células eram semeadas e mantidas sob atmosfera úmida de 5% de CO₂, à 37°C. O meio de cultura era trocado, diariamente, as células examinadas em microscópio invertido Nikon Diaphot (BOROJEVIC et al., 1985) e usadas nos experimentos quando atingissem a confluência.

III.2.2. Indução do fenótipo lipocítico

O fenótipo lipocítico foi induzido a partir de culturas sub-confluentes, tratando as células por 5 dias com meio de cultura padrão suplementado com 3µM de uma solução de all-trans retinol. A solução estoque de retinol era preparada com etanol absoluto e a concentração final de etanol nas culturas nunca ultrapassou 0,1%. O fenótipo lipocítico também foi induzido a partir de culturas sub-confluentes, tratando as células com meio de cultura suplementado com uma solução de indometacina 0,13mM por um período de cinco dias. (BOROJEVIC et al., 1990).

III.3. Avaliação da atividade da SPT

III.3.1. Obtenção da fração microssomal

As células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 75cm² (1x10⁶/garrafa). Após atingir a confluência, as células foram lavadas três vezes com PBS, raspadas e centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em 1ml da Solução A, contendo 0,32M sacarose, 50mM HEPES, 5mM EDTA, pH 7,4 a 4°C e sonicado. A fração microssomal foi obtida por centrifugação diferencial. Primeiramente, procedeu-se uma centrifugação para a remoção de núcleos, mitocôndrias e fragmentos de células a 10.000g/20minutos/4°C em centrífuga Hitachi CS120GX (rotor S120AT2-0211; tubos S300535A capacidade de 1ml). Após o sobrenadante foi

centrifugado a 105.000g/1h/4°C. A fração microssomal, então, obtida foi suspensa com a Solução B, contendo 50mM HEPES, 5mM ditioneitol, 5mM EDTA (MANDON et al., 1991).

O conteúdo de proteínas foi estimado pelo método Comassie Blue, utilizando albumina bovina sérica como padrão (BRADFORD, 1976).

III.3.2. Sistema de incubação para verificar a atividade da SPT

A atividade enzimática foi determinada pela medida da incorporação de L-[3-¹⁴C]serina em 3-ceto-dihidro-esfingosina (3-KDS) (MERRILL e WANG, 1992). O precursor radioativo foi diluído com o equivalente não-radioativo de modo a obter-se uma atividade específica final de 10mCi/mmol.

Cada tubo de reação (volume final de 100µl) continha 0,1M HEPES (pH 7,4), 2,5mM EDTA, 5mM DTT, 50µM piridoxal fosfato, palmitoil CoA, serina, L-[3-¹⁴C]serina e proteína microssomal (fonte enzimática). As quantidades de proteína, serina e palmitoil CoA foram definidas de acordo com as figuras IV.1., IV.3. e IV.4., respectivamente.

A reação foi iniciada pela adição de palmitoil CoA e o sistema incubado por tempo determinado (figura IV.2.) a 37°C, sob agitação constante. Tubos controles foram utilizados, os quais continham todos os componentes do sistema, exceto palmitoil CoA, a fim de descontar a incorporação radioativa relativa ao substrato endógeno.

III.3.3. Processamento após incubação

A reação foi parada pela adição de clorofórmio/metanol (1:2, v/v). A fim de facilitar a extração da 3-KDS, foi adicionado um carreador, 50µl de uma solução de clorofórmio-metanol (1:2, v/v) contendo 25µg de DL-eritro-dihidroesfingosina e deixou-se em repouso no gelo, por 5 minutos. Os conteúdos de serina e palmitoil CoA que não reagiram e outros componentes solúveis em água foram removidos por um procedimento de partição entre fases orgânica e aquosa, através a adição de clorofórmio (1ml) e NH₄OH 0,5N (2 ml) (MERRILL E WANG, 1992). Os tubos foram vigorosamente agitados, centrifugados e assim obteve-se a separação entre a fase orgânica e a aquosa. A fase inferior (orgânica) foi removida por aspiração e lavada 2 vezes, com água. A fase inferior resultante foi transferida para *vials* de cintilação. O solvente foi

evaporado e um volume de 3ml de líquido de cintilação (POP/POPOP/tolueno 4g:5mg: 1000mL) foi adicionado e as amostras posteriormente contadas em aparelho de cintilação líquida (WALLAC 1409), por 120 segundos.

A atividade enzimática da SPT foi expressa em picomoles de serina transferida por miligrama de proteína por minuto, após subtração da radioatividade dos tubos controles.

III.3.4. Identificação do produto da reação

A análise cromatográfica dos produtos radioativos presentes na fase orgânica procedeu-se utilizando o resíduo seco de um dos ensaios da atividade da SPT. Este resíduo foi suspenso em 500, 250 e 100µl de clorofórmio-metanol (5:3, v/v), sucessivamente, após cada evaporação, a fim de concentrar todo o conteúdo no fundo do tubo. Por último o resíduo foi dissolvido em 20µl do mesmo solvente e aplicado numa placa de cromatográfica em camada delgada de sílica gel 60.

Realizou-se a separação cromatográfica em uma mistura de solventes constituída por clorofórmio/metanol/NH₃OH 2N (40:10:0,5, v/v) (WILLIAMS et al., 1984). As bandas radioativas foram visualizadas por exposição da placa de TLC a filme de raio-X a -70°C, por 10 dias e comparadas com L[U-¹⁴C]serina, DL-eritro-dihidroesfingosina (esfinganina), esfingosina e ceramida. Os padrões não-radioativos foram corados com Comassie Blue (NAKAMURA e HANDA, 1984).

III.4. Avaliação das vias de síntese *de novo*, de reciclagem da *esfingosina* e de reciclagem através do *Golgi*

III.4.1. Avaliação dos glicosfingolípídios na presença de inibidores biossintéticos

Para a avaliação metabólica das diferentes rotas de síntese de gangliosídios as células foram semeadas em placas de seis poços (5 x 10⁵ células/poço para o miofibroblasto e 3 x 10⁵ células/poço para o lipócito). O estudo foi feito nos fenótipos de miofibroblasto e lipócito. Para as inibições da ceramida sintase e da SPT as células foram pré-incubadas com 25µM fumonisina B1 por 24h e 5mM β-cloroalanina por 1 h, respectivamente, e então 1µCi/ml D[U-¹⁴C]galactose foi

adicionado na presença contínua dos inibidores por mais 24 h (ZIULKOSKI, et al., 2001). Foram realizadas, simultaneamente, culturas controles (sem inibidores) dos dois fenótipos da GRX.

III.4.2. Isolamento e análise dos glicosfingolipídios celulares

Depois da incubação, o meio radioativo foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS, raspadas da placa e o sedimento celular obtido por centrifugação a 3000rpm durante 10 minutos (centrífuga Sorwal-RCM-14). O sobrenadante foi desprezado e as paredes do *eppendorf* foram secas para que não houvesse interferência na extração lipídica. O sedimento foi suspenso em 400µl de metanol e sonicado (2 x 30 segundos com intervalo de 60 segundos, em gelo). Em seguida adicionou-se 800µl de clorofórmio e deixou-se o material a temperatura ambiente, por 10 minutos, para ocorrer a extração dos lipídios. Prosseguiu-se com uma centrifugação por 10 minutos, a 10000 rpm, na mesma centrífuga. Obteve-se um sedimento protéico, no qual se determinou a quantidade de proteínas (LOWRY et al., 1951) e um sobrenadante (extrato lipídico), o qual foi evaporado.

O extrato lipídico seco, foi suspenso com 1ml de clorofórmio/metanol/água (3:48:47, v/v/v) e purificado por cromatografia da fase reversa usando coluna Sep-Pack C18 (WILLIAMS e McCLUER, 1980; ANDRADE et al., 2003).

Do extrato de lipídio purificado, uma alíquota foi separada para medir a radioatividade (adição de líquido de cintilação; Cintilador: WALLAC 1409) e o restante analisado por HPTLC com dois sistemas de solventes sucessivos: o primeiro foi clorofórmio/metanol (4:1 v/v), e, o segundo clorofórmio/metanol/0,25% CaCl₂ aquoso (60:36:8, v/v). A segunda migração foi feita no cuba descrita por NORES et al., 1994. Os esfingolipídios radioativos foram visualizados expondo a placa HPTLC ao filme radiográfico (Kodak X-Omat AR) em -70°C por 30 dias. A quantificação foi feita pela densitometria do filme autorradiográfico em um densitômetro CS 930 Shimatzu UV/vis. Os padrões foram revelados como resorcinol-HCl (gangliosídios) (SVENNERHOLM, 1957; LAKE e GOODWIN, 1976) e por Comassie Blue (esfingomielina, lactosilceramida e glicosilceramida) (NAKAMURA e HANDA, 1984).

III.4.3. Estimativa da incorporação radioativa nos glicosfingolipídios em cada uma das três rotas biossintéticas

A quantidade de radioativo incorporado nos glicosfingolipídios por meio das três rotas foi estimada através das seguintes equações: rota 1 (*de novo*) = quantidade inibida pela β -cloroalanina, rota 2 (reciclagem da *esfingosina* e *esfinganina*) = quantidade inibida pela fumonisina B1 menos a quantidade inibida pela β -cloroalanina, e rota 3 (reciclagem pelo *Golgi*) = quantidade não inibida pela fumonisina B1 (GILLARD et al., 1996).

IV. RESULTADOS

Este item da dissertação está dividido em dois sub-itens. O primeiro se refere ao estudo dos parâmetros cinéticos da SPT na linhagem GRX, usando o fenótipo miofibroblasto, Estas condições foram utilizadas na avaliação comparativa entre os dois fenótipos. O segundo sub-ítem corresponde ao manuscrito que será submetido à revista *Experimental Cell Research*.

IV.1 Determinação das condições adequadas para a avaliação da atividade da serina palmitoiltransferase

Os parâmetros cinéticos estudados para a enzima SPT na linhagem celular GRX correspondem à determinação da quantidade de proteína, do tempo de incubação e da concentração dos substratos serina e palmitoil CoA. A fração microsomal das células GRX no fenótipo miofibroblástico foi utilizada como fonte de enzima.

IV.1.1. Efeito da variação da quantidade de proteína sobre a atividade da SPT

Variando-se a quantidade de proteína microsomal no sistema de incubação da SPT, observa-se que a atividade da enzima é linear até 50 μ g tendendo a um platô nas quantidades superiores (Figura IV.1).

IV.1.2. Efeito da variação do tempo de incubação sobre a atividade da SPT

Variando-se o tempo de incubação, observa-se uma atividade crescente da SPT e linear até 40 minutos (Figura IV.2).

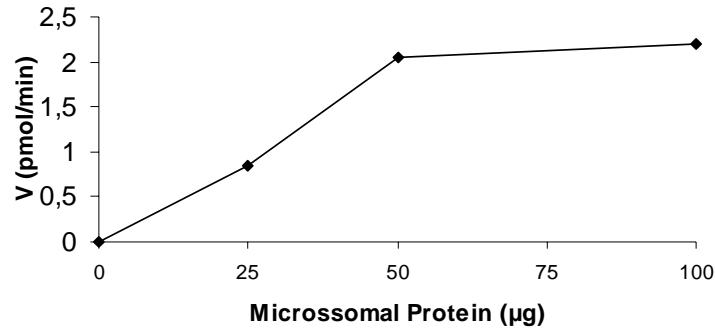


Figura IV.1. Efeito da variação da quantidade de proteína sobre a atividade da SPT. Diferentes quantidades de proteína microssomal foram incubadas por 20 minutos na presença de 0,16mM de palmitoil CoA e 1mM L-[3-¹⁴C]serina. Detalhes técnicos foram descritos nos Materiais e Métodos. Os valores representam as médias dos dados obtidos em duplicata. V (pmol/min) representa a velocidade da enzima SPT, que expressa a quantidade de L-[3-¹⁴C]serina transferida, em pmol, a cada minuto de ação enzimática.

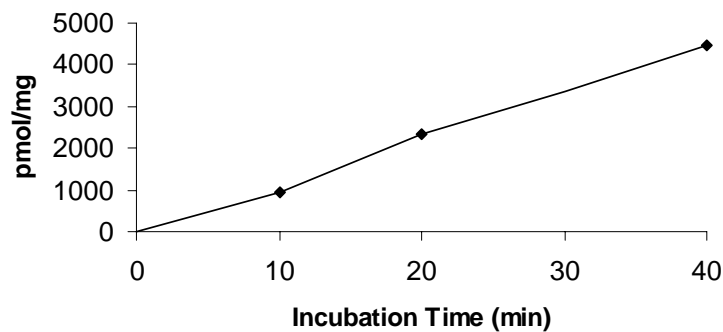


Figura IV.2. Efeito do tempo de incubação na atividade da SPT. As análises foram desenvolvidas conforme descrito em Materiais e Métodos, na presença de 50µg de proteína microssomal, 0,16mM de palmitoil CoA e 1mM L-[3-¹⁴C]serina. Os dados representam as médias dos dados obtidos em duplicata. A unidade pmol/mg representa a quantidade de L-[3-¹⁴C]serina transferida, por mg de proteína.

IV.1.3. Efeito da variação da concentração de serina sobre a atividade da SPT

Variando-se as concentrações de serina, observa-se que a incorporação deste substrato varia linearmente até 1mM. A partir desta concentração ocorre uma tendência a um platô até 1,8 mM e uma leve inibição em concentrações superiores (Figura IV.3).

IV.1.4. Efeito da variação da concentração de palmitoil-CoA sobre a atividade da SPT

Variando-se a concentração de palmitoil-CoA, observa-se uma saturação da enzima pelo substrato em concentrações superiores a 0,05mM, e em concentrações superiores a 0,2mM observa-se uma tendência à inibição da atividade enzimática (Figura IV.4).

De acordo com os dados acima foi estabelecido que as condições adequadas para a avaliação da atividade da enzima SPT na linhagem celular GRX seriam: a incubação durante 30 minutos, a 37 °C de, 45 µg de proteína microsomal, 1,2mM de L-[3-¹⁴C]serina (A.E. 10 mCi/mmol) e 0,16mM de palmitoil-CoA.

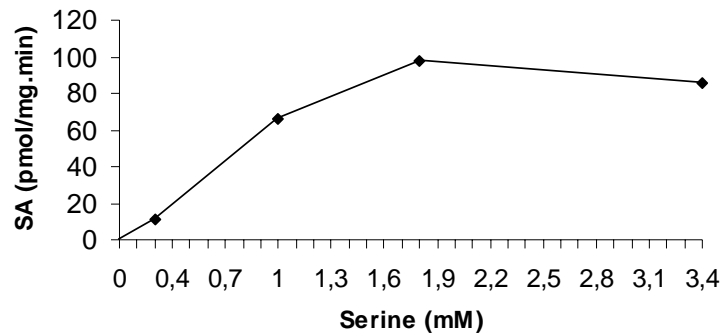


Figura IV.3. Atividade da SPT em função da concentração de serina. Incubou-se a mistura de reação, contendo 50 μ g de proteína microsomal, 0,16mM de palmitoil CoA e concentrações variáveis de serina por 20 minutos como descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam as médias dos dados obtidos em duplicata. SA (pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima SPT, que foi expressa em quantidade de L-[3-¹⁴C]serina transferida, em pmol por mg de proteína, a cada minuto.

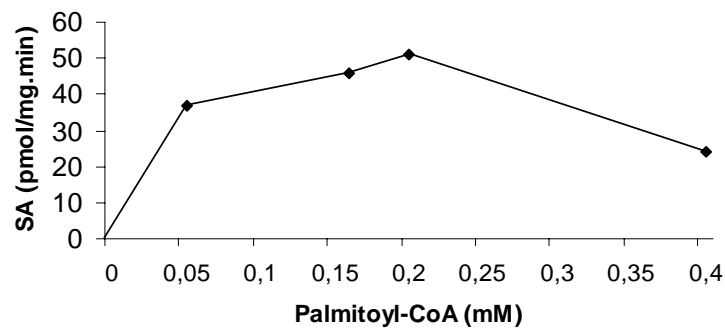


Figura IV.4. Atividade da SPT em função da concentração de palmitoil-CoA. Distintas quantidades de palmitoil CoA foram incubadas por 20 minutos na presença de 1mM L-[3-¹⁴C]serina com 50 μ g de proteína microsomal. Os outros componentes da reação foram descritos nos Materiais e Métodos. Os dados representam as médias dos dados obtidos em duplicata. SA (pmol/mg.min) representa a atividade específica da enzima SPT, que foi expressa em quantidade de L-[3-¹⁴C]serina transferida, em pmol, por mg de proteína, a cada minuto.

IV.1.5. Identificação do produto de reação da SPT

Para a visualização do produto da reação da SPT, foi realizado um experimento representativo usando os parâmetros mencionados anteriormente. Nestas condições, a maioria dos produtos radioativos formados, solúveis em clorofórmio-metanol, foram 3-ceto-dihidro-esfingosina e esfingosina (Figura IV.5). A 3-ceto-dihidro-esfingosina apresentou um Rf aproximado ao descrito na literatura (WILLIAMS et al, 1984).



Figura IV.5. Auto-radiografia do produto da atividade da SPT.

Cer: ceramida

3-KDS: 3-ceto-dihidro-esfingosina

SO: esfingosina.

IV.2. Minuta do trabalho científico a ser submetido no periódico

Experimental Cell Research

De Novo Synthesis and Recycling Pathways of Gangliosides in Myofibroblast and Lipocyte Phenotypes of a Hepatic Stellate Cell Line (GRX).

Aline B. de Aguirres¹; Paola A. Mello¹; Claudia M. B. Andrade¹; Regina M. Guaragna¹; Radovan Borojevic²; Fátima C.R. Guma,¹ and Vera.M.T. Trindade^{1*}.

¹Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS and ²Depto Histologia e Embriologia, ICB, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

*Corresponding author: Depto Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo
CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
Fax Number: +55-51-33-16-55-35
E-mail address: vmtt@ufrgs.br

ABSTRACT

GRX cell line represents hepatic stellate cells, expresses myofibroblast phenotype, and can be induced *in vitro* to lipocyte. Both phenotypes show doublet gangliosides of a-series (GM2, GM1 and GD1a) and their precursor GM3. To study the doublet ganglioside synthesis in GRX phenotypes it was firstly determined the activity of the key enzyme serine palmitoyltransferase (SPT). To evaluate the contribution of the 3 biosynthetic pathways, cells were preincubated with 5mM β -chloroalanine (inhibits SPT) or with 25 μ M fumonisin B1 (inhibits ceramide synthase) and then radiolabeled with [U-¹⁴C]galactose in continued presence of inhibitors. Gangliosides were extracted, purified and analyzed by HPTLC. In both phenotypes *de novo* synthesis, *sphingosine* and *Golgi* recyclings contributed with glycosphingolipid biosynthesis. In myofibroblasts, both bands in the HPTLC of complex gangliosides (GD1a and GM1) are mainly synthesized by recycling pathways; GM2 and GM3 bands have important biosynthetic participation of *de novo* pathway. In lipocytes, *de novo* pathway has a minor contribution than in myofibroblast and this is in agreement with level of SPT activity detected in both phenotypes. It is suggests that myofibroblast and lipocyte use distinct ceramide pools for their GSL synthesis and present important differences between biosynthetic pathways that could reflect their cellular behavior.

Keywords: ganglioside metabolism; glycosphingolipid salvage pathways; β -chloroalanine; fumonisin B1; serine palmitoyltransferase; hepatic stellate cell.

INTRODUCTION

Sphingolipids are defined as lipids containing sphingoid bases as a structural backbone. They are typically found in eukaryotic cells where they occur mainly in the plasmatic membrane and in cell organelles such as the endoplasmatic reticule (ER), the Golgi apparatus, the endosomes and the lysosomes [1]. They represent a little (10-20%) but vital portion of the lipidic membrane [2]. Sphingolipids are involved in modulating membrane organization and fluidity, modulation of signaling by cell membrane receptors, regulation of cell growth, regulation of cell-cell and cell-substrate interactions, cell differentiation and apoptosis [3].

There are several potential pathways for the synthesis of sphingolipids (Figure 1). In the *de novo* synthesis (pathway 1), the first steps involved in sphingolipids biosynthesis occur on the citoplasmatic face of the ER and they are the condensation of serine and palmitoyl CoA, a reaction catalyzed by serine palmitoyltransferase (SPT) [EC 2.3.1.50], a pyridoxal 5'-phosphate (PLP) dependent reaction, to produce 3-ketosphinganine or 3-ketodihydroesphingosine (3-KDS). SPT is suggested to be a key enzyme for regulation of sphingolipids synthesis. 3-KDS is rapidly reduced to sphinganine, which is acylated to form dihydroceramide, which is converted to ceramide by a desaturase. The next step in glycosphingolipid (GSL) synthesis, addition of glucose to dihydroceramide or ceramide, takes place on the citoplasmatic face of the cis-Golgi. Glucosyl ceramide is then transported either directly to the plasma membrane or turned, by a yet uncharacterized flippase, to the luminal side of the cis-Golgi stack, where further glycosylations take place, and where from GSL intermediates are transported to trans-Golgi, taking across medial-Golgi [4,5]. In the recycling synthesis (pathway 2), sphingosine and sphinganine arising in lysosomes from hydrolysis of sphingolipids, can be reacylated to form ceramide or (dihydro)ceramide and then transported to the Golgi and further metabolized as discussed above.

Another pathway (pathway 3) involves the transport of native or partially hydrolyzed GSL from endosomes to the Golgi, where the sugar chains may be elongated [6].

An estimate of the quantity of sugar incorporated into GSL in the three pathways can be obtained by the use of two inhibitors of sphingolipid synthesis, β -chloroalanine, which inhibits the synthesis of sphinganine (pathway 1) [7,8] and fumonisin B1, which inhibits the acylation of sphinganine and sphingosine (pathway 2 and 3) [8,9,10]. The relative contribution of these pathways were examined in several cell lines, like human foreskin fibroblasts, mouse NB41A3 neuroblastoma cells, mouse C2C12 myoblasts, rat C6 glioma cells [11] and in rat Sertoli cells [12].

Hepatic stellate cells (HSC) are also known as lipocytes, fat storing cells, Ito cells or perisinusoidal cells, and are localized in the space of Disse and are capable of expressing a dual phenotype. In normal liver, they express the quiescent phenotype. They are long-lived cells with low proliferative activity and contain characteristic lipid droplets which can concentrate more than 75% of hepatic retinoids. In chronically diseased liver, HSC acquired the activated phenotype and differentiate in myofibroblasts, a process whereby they acquire a high proliferative activity, lose their lipid droplets and develop a prominent rugose endoplasmic reticulum, large microtubules and actin bundle with local condensations [13].

The GRX cell line was established through the induction of fibrotic granuloma in rats liver experimentally infected with *Schistosoma mansoni* [14]. These cells express the myofibroblast phenotype under standard culture conditions, and can be induced *in vitro* to display the fat storing phenotype by treatment with retinoids or indomethacin.

Both GRX cell line phenotypes (myofibroblast and lipocyte) showed gangliosides of the a-series (GM2, GM1 and GD1a) as well as their precursor GM3. Sphingomyelin and all the

gangliosides were expressed as doublets; in the TLC, the upper/lower band ratio increased in lipocytes and this phenotype features a higher amount of the long-chain fatty acids band (C22 and C24). The lipocytes also presented two times more the total amount of gangliosides and a higher GM2 synthase activity [15].

In order to study if these upper and lower GSL bands could be synthesized by the same way we determined the SPT activity (key enzyme of sphingolipids synthesis) in myofibroblast and lipocyte phenotypes of the GRX cell line. We also used sphingolipid synthesis inhibitors, β -chloroalanine and fumonisin B1, to evaluate the contributions of the 3 different pathways (*de novo* synthesis, *sphingosine* recycling and *Golgi* recycling) for GRX cell's GSL synthesis.

MATERIAL AND METHODS

Materials

D-[U-¹⁴C]galactose (285mCi/mmol), L-[3-¹⁴C]serine (54mCi/mmol) were purchased from Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK). All-trans-retinol, indomethacin, palmitoyl coenzyme A, pyridoxal 5'-phosphate, HEPES, dithiothreitol, EDTA, DL-erythrodihydrosphingosine, phosphatidylserine, phosphatidylcholine, glucosylceramide, lactosylceramide, GM3, GM2, GM1 and GD1a gangliosides, sphingomyelin, radiographic film Kodak X-Omat AR and Dubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Silica-gel 60 thin-layer chromatography (TLC) and high performance thin-layer chromatography (HPTLC) sheets were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). Sep-Pack C18 cartridges were obtained from Waters (Milford, MA, USA). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). All other chemicals and solvents used were of analytical grade.

Cell Cultures

The cell line GRX was provided by the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil). The cell line stores were cryopreserved in liquid nitrogen at approximately -200°C. Cells were routinely maintained in the standard medium: DMEM supplemented with 5% FBS and 2mg/ml HEPES buffer, pH 7.4, under a humidified 5% CO₂ atmosphere, at 37°C [16].

Induction of the Lipocyte Phenotype

Cells were plated in 75cm² tissue culture flasks using 1 x 10⁶ cells/flask (microsome isolations) or in plates with 6 wells using 3 x 10⁵ cells/well (radiolabeling experiments). The fat-storing phenotype was induced by incubation of sub-confluent cultures with the standard medium, supplemented with 3µM all-trans-retinol, dissolved in ethanol (0,1% final concentration) or with 0,13mM indomethacin for 5 days [14].

Isolation of Microsomes

Cells were plated in 75cm² tissues culture flasks. Confluent cultures were washed three times with cold phosphate buffered saline (PBS), scrapped from the plate and pelleted by brief centrifugation. The pellet was resuspended in Sol A (0,32M sacarose, 50mM HEPES and 5mM EDTA, pH 7,4 at 4°C) and sonicated. The microsomal fraction was obtained by differential ultracentrifugation according to [17] and was then taken up in Sol B (50mM HEPES, 5mM dithiothreitol, 5mM EDTA). Protein content was estimated by the Comassie Blue method [18], utilizing serum bovine albumin as standard.

Assay of Serine Palmitoyltransferase Activity

The enzymatic activity was determined by measuring the incorporation of L-[3-¹⁴C]serine into 3-ketodihydrosphingosine (3-KDS), according to [8,19]. Radioactive materials were diluted with nonradioactive ones to a final specific activity of 10mCi/mmol. Each tube (100µl final volume) containing 0,1M HEPES (pH 7,4), 2,5mM EDTA, 5mM dithiothreitol, 50µM pyridoxal phosphate, palmitoyl-CoA, serine, L-[3-¹⁴C]serine and microsomal protein. Previously it was established that the ideal conditions for measurement of SPT activity were with 45 µg of protein,

1,2mM of L-[3-¹⁴C]serine, 0,16mM of palmitoyl-CoA, during 30 minutes, at 37°C under constant shaking. Control tubes containing all system compounds minus palmitoyl-CoA were utilized in order to discount the radioactive incorporation of the endogenous substrate. The reaction was stopped by addition of chloroform/methanol (1:2, v/v). In order to facilitate the recovery of 3-ketosphinganine, a carrier was added (25µg of DL-erythro-dihydrosphingosine suspended in chloroform/methanol (1:2, v/v). Serine and palmitoyl-CoA contents that didn't react and other water' soluble components were removed by a partition procedure between an organic and an aqueous phases [8]. The organic phase was transferred to vials and dried. Liquid scintillation was added and radioactivity measured in a liquid scintillation counter.

Chromatographic analysis of the radiolabeled chloroform/methanol products was carried out with a dried extract from one assay of SPT suspended in chloroform/methanol (5:3, v/v). This material was run on silica gel 60 thin layer sheet using chloroform/methanol/NH₃OH 2N (40:10:0,5, v/v) as solvent mixture [20]. Radioactive bands were visualized by exposing the TLC sheet to X-ray film at -70°C for 10 days and compared to [¹⁴C]serine, DL-erythro-dihydrosphingosine (sphinganine), sphingosine and ceramide. Nonradioactive bands were identified by Comassie Blue staining [21].

The enzymatic activity of SPT was expressed as picomoles serine transferred per milligram protein per minute, after subtracting the background radioactivity (control tubes).

Labeling of Glycosphingolipids in Presence of Biosynthetic Inhibitors

Metabolic labeling was performed with 1µCi of [U-¹⁴C] galactose per one milliliter of culture medium, during 24h, using sub confluent GRX cells (myofibroblast and lipocyte

phenotypes) [15]. For SPT or ceramide synthase inhibitions, cells were preincubated for 1h or 24h with 5mM β -chloroalanine or 25 μ M fumonisin B1, respectively, and then radiolabeled in the continued presence of the inhibitors [12]. Control cultures (without inhibitors) of both GRX phenotypes were simultaneously carried out.

Isolation and Analysis of Cellular Glycosphingolipids

After metabolic labeling the radioactive medium was removed, cells were washed with cold phosphorus buffered saline, scrapped and pelleted by brief centrifugation. Lipids were extracted from the cell pellet with chloroform/methanol (2:1, v/v). The total lipid extract was dried under nitrogen atmosphere, suspended with 1mL chloroform/methanol /water (3:48:47, v/v/v) and purified by reverse-phase chromatography using Sep-Pack C18 cartridges [15,22]

An aliquot of the purified extract (approximately 3000 cpm) was analyzed by HPTLC silica gel 60 plates with two successive solvents systems: first, chloroform/methanol (4:1 v/v) and second, chloroform/methanol/0.25%aqueous CaCl_2 (60:36:8, v/v). The second migration was run in a TLC tank developed by Nores et al. [23]. Radioactive sphingolipids were visualized by exposing the HPTLC plate to radiographic film at -70°C for 30 days and their relative contribution was determined by densitometric scanning of the X-ray film in a CS 930 Shimadzu UV/vis densitomer. Standards were visualized by exposure to resorcinol-HCl (gangliosides) [24,25] and by Comassie Blue (sphingomyelin, lactosylceramide and glicosylceramide) [21]. Protein sediment obtained after lipid extraction was made solvable with NaOH 1N and measured by the method of [26] using bovine serum albumin as standard.

Estimation of radioactive precursor incorporation into glycosphingolipids in each of three pathways

The quantity of radioactivity incorporated into glycosphingolipids in the three pathways was estimated from the following equations: pathway 1 (*de novo*) = amount inhibited by β -chloroalanine, pathway 2 (sphingosine recycling) = amount inhibited by fumonisin B1 minus amount inhibited by β -chloroalanine, and pathway 3 (recycling through the *Golgi* apparatus) = amount not inhibited by fumonisin B1 [27].

Statistical analysis

Differences among the experimental groups were analyzed by one way analysis of variance and means were compared by the Duncan test.

RESULTS

SPT activity in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes

STP activity was assessed according to the kinetic parameters previously established (data not shown). The sphingolipid biosynthesis committed enzyme activities in the GRX cell phenotypes are showed in figure 2. SPT activity was higher in the myofibroblast than in the lipocyte phenotype induced either with retinol or with indomethacin. The enzyme activities do not differ in both lipocyte conversion conditions.

Pathways of gangliosides biosynthesis in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes

To determine the contribution of the different biosynthetic pathways to the doublets gangliosides (slower = b1 band and faster = b2 band) in the two phenotypes of GRX cells it was used the radioactivity incorporation of ^{14}C -galactose precursor into ganglioside species in presence or absence of fumonisin B₁ and β -chloroalanine.

Figure 3 illustrates the ganglioside patterns of myofibroblast and lipocyte cultures treated with both sphingolipid synthesis inhibitors and table 1 shows the respective autoradiography and densitometric analysis. They reveal that fumonisin B₁ inhibited mainly the expression of b1 from all myofibroblast gangliosides; both bands of complex gangliosides (GD1a and GM1) and b2 of GM2 and GM3 gangliosides from lipocyte. On the other hand, β -chloroalanine had an important inhibitor effect on the expression of both bands of GM2 and GM3 gangliosides in myofibroblast, and on b2 of these gangliosides in the lipocyte phenotype.

The participation of the three pathways of sphingolipid biosynthesis is demonstrated in figure 4. In both phenotypes the pathways 1 (*de novo*), 2 (*sphingosine* recycling) and 3 (*Golgi* recycling) contribute with ganglioside biosynthesis. In myofibroblasts, complex gangliosides (GD1a, GM1) are synthesized mainly by recycling pathways (b1: *sphingosine* recycling; b2: *Golgi* recycling), while GM2, GM3 ganglioside bands have considerable biosynthesis participation of *de novo* pathway. The *recycling* pathways are the major biosynthetic routes for the lymphocytes, however both bands of GM2 and band 2 of GM3 have appreciable biosynthesis by *de novo* pathway.

DISCUSSION

The experimental model of the permanent cell line GRX has allowed the analysis and the comparison of several parameters from hepatic stellate cell metabolism in the myofibroblast versus lipocyte phenotype such as: neutral lipid and phospholipid synthesis [28,29,30]; extracellular matrix and collagen synthesis [31,32]; activity of enzymes involved in lipid and retinol metabolism [33,34,35]; intermediate filament expression [36]; actin organization [37]; and beta-carotene storage [38]. Both phenotype showed the presence of gangliosides of the a-series (GM2, GM1 and GD1a) as well as their precursor GM3; all gangliosides were expressed as doublets and lipocyte sphingolipids contain more long-chain fatty acid than myofibroblast [15].

In this way, the present report studied the doublet ganglioside synthesis in GRX phenotypes describing the activity of SPT (committed enzyme in sphingolipid synthesis) and demonstrating the relative contributions of each pathway of sugar incorporation into on GSL synthesis. Sugar can be added to ceramide that contains sphinganine (dihydrosphingosine) synthesized *de novo* (pathway 1), to ceramide synthesized from sphingoid bases produced by hydrolysis of sphingolipids (pathway 2), or to GSL recycling from endosomal pathway through the *Golgi* (pathway 3) (Figure 1).

It was observed that the three pathways participate in glycosphingolipid biosynthesis on both GRX cell phenotypes with some differences. In myofibroblasts, both bands of complex gangliosides (GD1a and GM1) are mainly synthesized by recycling pathways while a considerable *de novo* pathway synthesizes GM2 and GM3 doublets. These gangliosides, in lipocytes, are synthesized by minor contribution of *de novo* pathway and a noticeable *Golgi* recycling could be observed for the under band of GM3 ganglioside [GM3(1)]. These results suggest a smaller importance of *de novo* pathway in lipocytes than in myofibroblasts. The major

participation of *de novo* biosynthesis in myofibroblasts is in accordance with the higher SPT activity detected in this phenotype and is consistent with the requirement for synthesis of cell membranes in rapidly dividing cells such as GRX-myofibroblast [39] and C2C12 myoblast [11].

Furthermore, the proportion between the *Golgi* and *sphingosine* recycling pathways is variable for majority of gangliosides in both GRX cell phenotypes. For example, in miofibroblast, 40% GD1a(1) is synthesized by *sphingosine* recycling and 60% by *Golgi*, while in lipocyte it is the reverse. Similar situation was reported for human adrenal carcinoma cell line (SW13), human foreskin fibroblasts, mouse NB41A3 neuroblastoma and rat C6 glioma [27,11].

The results now described are in agreement with the current knowledge about the organization of ganglioside biosynthesis considering the intermediates of this process, sub-Golgi location of glycosyltransferases, and including intracellular ganglioside transport and enzyme sorting [40, 41, 42].

Taken together our previous findings on GRX cell where the upper/lower band ratio of gangliosides increased in lipocytes due to the presence of more long-chain fatty acids (C22, C24 or C24:1) into lipocyte ceramide backbones than into myofibroblasts [15], and the present data of the ganglioside biosynthetic pathways made us to think about the possibility of transacylase actions as described for phospholipids [43]. The performance of these enzymes could change long-chain fatty acids from ceramide portion of glycosphingolipids and could justify a probable distinct ceramide precursor pools for their synthesis, intracellular transport and membrane segregation [42, 44]. In addition, it could explain, at least in part, the higher content of upper band in lipocyte phenotype.

On the other hand, from the three synthesis pathways, the *Golgi* recycling is the only that involves direct glycosilation without affecting the quality of the fatty acid present in the

gangliosides that reach this organelle. It simplifies the analysis of the data obtained about this pathway, which could provide extra information about the endocytic transport selectivity of the GSL particular species. For example, in the lipocyte phenotype, the GM3(1) comes exclusively from *Golgy* recycling. At least, it partially implies that the precursor GlcCer or LacCer are selectively transported to the Golgy complex for its direct reglicosilation. After that the GM3(1) is transported to the cell surface and can not be utilized as substratum in the Golgi. Another interesting exemple is the GM1(2) and the GD1a(2) of the myofibroblast phenotype which come exclusively from *Golgy* recycling. Curiously the simplest gangliosides of both phenotypes come from the *de novo* pathway and the most complex from the recycling pathways. It is evident that a fraction of the simple gangliosides runs through the Golgy complex without later glycosilation to reach the plasmatic membrane, while the complex gangliosides synthesis require recycling through the Golgy or through the lisosomes. The GM3(2) and the GM2(2) are selectively transported to the Golgy in order to be reglycosilated to GM1 from which a part is transported to the plasmatic membrane surface and another part is sialilated to form GD1a(2) [40, 45, 46].

Interestingly, the *de novo* pathway contribution for myofibroblast GM3 synthesis, beside this ganglioside to be a relative minor component, could be relevant, considering its modulation on proliferation, on migration of myofibroblasts inside the regenerating or in fibrosing liver tissue [47] and its strong influence on integrin-Fibroblast Growth Factor Receptor “cross-talk” [48].

In conclusion, the results of SPT activity and the analysis of the precursor radioactivity incorporation into gangliosides in presence of sphingolipid synthesis inhibitors suggest that myofibroblast and lipocyte phenotypes of GRX cell line present important differences between three GSL biosynthetic pathways that could reflect their cellular behavior.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNPQ, FAPERGS and PROPESQ/UFRGS.

REFERENCES

- [1] A.H.Jr. Merrill, D.D. Jones, An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism, *Biochim. Biophys. Acta* 1044 (1990) 1-12.
- [2] J.C. Holthuis, T. Pomorski, R.J. Raggars, H. Sprong, G. Vab Meer, The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport, *Physiol. Ver.* 81 (2001) 1689-1723.
- [3] Y.A. Hannun, C. Luberto, K.M. Argraves, Enzyme os sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling, *Biochemistry* 40 (2001) 48993-4903.
- [4] G. Schwarzmann, K. Sandhoff, Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids, *Biochemistry* 29 (1990) 10865-10871.
- [5] G. Tettamanti, Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* 20 (2004) 301-317.
- [6] G. Tettamanti, R. Bassi, P. Viani, L. Riboni, Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism, *Biochimie* 85 (2003) 423-437.
- [7] K.A. Medlock, A.H.Jr. Merrill, Inhibition of serine palmitoyltransferase in vitro and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by beta-chloroalanine. *Biochemistry* 27 (1988) 7079-7084.
- [8] A.H.Jr. Merrill, E. Wang, Enzymes of ceramide biosynthesis, *Methods Enzymol.* 209 (1992) 427-431.
- [9] A.H.Jr. Merrill, G. van Echten, E. Wang, K. Sandhoff, Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 27299-27306.
- [10] A.H.Jr. Merrill, E. Wang, D.G. Gilchrist, R.T. Riley, Fumonisin and other inhibitors of *de novo* sphingolipid biosynthesis, *Adv. Lipid Res.* 26 (1993) 215-234.
- [11] B.K. Gillard, R.G. Clement, D.M. Marcus, Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in *de novo* and recycling pathways, *Glycobiology* 8 (1998) 885-890.
- [12] A.L. Ziulkoski, A.R. Zimmer, J.S. Zanettini, L.C. Trugo, F.C. Guma, Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells, *Mol. Cell Biochem.* 219 (2001) 57-64.
- [13] M.L. Hautekeete, A. Geerts, The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease, *Virchows Arch.* 430 (1997) 195-207.
- [14] R. Borojevic, R.M. Guaragna, R. Margis, H.S. Dutra, *In vitro* induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26 (1990) 361-368.
- [15] C.M. Andrade, V.M.T. Trindade, C.C. Cardoso, A.L. Ziulkoski, L.C. Trugo, R.M. Guaragna, R. Borojevic, F.C. Guma, Changes of sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells, *J. Cell Biochem.* 88 (2003) 533-544.
- [16] R. Borojevic, A.N. Monteiro, S.A. Vinhas, G.B. Domont, P.A. Mourão, H. Emonard, G.JR. Grimaldi, J.A. Grimaud, Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21 (1985) 382-390.
- [17] E.C. Mandon, G. van Echten, R. Birk, R.R. Schmidt, K. Sandhoff, Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 667-674.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

- [19] L.N. Rotta, C.G. da Silva, M.L. Perry, V.M.T. Trindade, Undernutrition decreases serine palmitoyltransferase activity in developing rat hypothalamus, *Ann. Nutr. Metab.* 43 (1999) 152-158.
- [20] R.D. Williams, E. Wang, A.H.Jr. Merrill, Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase activity in rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 228 (1984) 282-291.
- [21] K. Nakamura, S. Handa, Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates, *Anal. Biochem.* 142 (1984) 406-410.
- [22] M.A. Williams, R.H. McCluer, The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides, *J. Neurochem.* 35 (1980) 266-269.
- [23] G.A. Nores, R.K. Mitzumari, D.M. Kremer, Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 155-157.
- [24] L. Svennerholm, Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, *Biochim. Biophys. Acta* 24 (1957) 604-611.
- [25] B.D. Lake, H.J. Goodwin, Lipids, in: I. Smith, J.W.T. Seakins (Eds.), *Paper and Thin Layer Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, William Heinemann Medical Books Ltd., London, UK, 1976, Vol. 1, pp. 345-366.
- [26] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [27] B.K. Gillard, R.G. Harrell, D.M. Marcus, Pathways of glycosphingolipid biosynthesis in SW13 cells in the presence and absence of vimentin intermediate filaments, *Glycobiology* 6 (1996) 33-42.
- [28] R.M. Guaragna, L. Trugo, R. Borojevic, Neutral lipid synthesis and accumulation during *in vitro* induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1085 (1991) 29-34.
- [29] R.M. Guaragna, L. Trugo, R. Borojevic, Phospholipid modifications during conversion of hepatic myofibroblasts into lipocytes (Ito-cells), *Biochim. Biophys. Acta* 1128 (1992) 237-243.
- [30] C.C. Cardoso, E.R. Paviani, L.A. Cruz, F.C. Guma, R. Borojevic, R.M. Guaragna, Effect of pentoxifylline on arachidonic acid metabolism, neutral lipid synthesis and accumulation during induction of the lipocyte phenotype by retinol in murine hepatic stellate cell, *Mol. Cell Biochem.* 254 (2003) 37-46.
- [31] R. Margis, M. Pinheiro-Margis, L.C. da Silva, R. Borojevic, Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX), *Int. J. Exp. Pathol.* 73 (1992) 125-135.
- [32] M. Pinheiro-Margis, R. Margis, R. Borojevic, Collagen synthesis in an established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype, *Exp. Mol. Pathol.* 56 (1992) 108-118.
- [33] C.P. Vicente, R.M. Guaragna, R. Borojevic, Lipid metabolism during *in vitro* induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells, *Mol. Cell Biochem.* 168 (1997) 31-39.
- [34] C.P. Vicente, V.A. Fortuna, R. Margis, L. Trugo, R. Borojevic, Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in an *in vitro* model of hepatic stellate cells, *Mol. Cell Biochem.* 187 (1998) 11-21.
- [35] V.A. Fortuna, L.C. Trugo, R. Borojevic, Acyl-CoA: retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) activation during the lipocyte phenotype induction in hepatic stellate cells, *Nutr. Biochem.* 12 (2001) 610-621.

- [36] F.C.R. Guma, T.G. Mello, C.S. Mermelstein, V.A. Fortuna, S.T. Wofchuk, C. Gottfried, R.M. Guaragna, M.L. Costa, R. Borojevic, Intermediate filaments modulation in an *in vitro* model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype, *Biochem. Cell Biol.* 79 (2001) 409-417.
- [37] C.S. Mermelstein, F.C. Guma, T.G. Mello, V.A. Fortuna, R.M. Guaragna, M.L. Costa, R. Borojevic, Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells: reorganization of the actin cytoskeleton, *Cell Tissue Res.* 306 (2001) 75-83.
- [38] R.B. Martucci, A.L. Ziulkoski, V.A. Fortuna, R.M. Guaragna, F.C. Guma, L.C. Trugo, R. Borojevic, Beta-carotene storage, conversion to retinoic acid, and induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells, *J. Cell Biochem.* 92 (2004) 414-423.
- [39] R. Radovan, R.M. Guaragna, R. Margis, M.P. Margis, C.P. Vicente, L.C. da Silva, *In vitro* conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocytes (Ito cells), in: E. Wisse, D.L. Knook, R.S. McCuskey (Eds.), *Cells of the Hepatic Sinusoid*, Kupffer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, 1991, Vol 3, pp. 249-252.
- [40] H.J.F. Maccioni, C.G. Giraudo, J.L. Daniotti, Understanding the stepwise synthesis of glycolipids, *Neurochem. Res.* 27 (2002) 629-636.
- [41] R.K. Yu, E. Bieberich, T. Xia, G. Zeng, Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 783-793.
- [42] S. Degroote, J. Wolthoorn, G. van Meer, The cell biology of glycosphingolipids, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 375-87.
- [43] A. Yamashita, T. Sugiura, K. Waku. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipid and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells, *J. Biochem. (Tokyo)* 122 (1997) 1-16.
- [44] R. Kannagi, E. Nudelman, S. Hakomori, Possible role of ceramide in defining structure and function of membrane glycolipids, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 (1982) 3470-3474.
- [45] H.J.F. Maccioni, J.L. Daniotti, J.A. Martina, Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1437 (1999) 101-118.
- [46] D.L. Marks, R.E. Pagano, Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease. *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 605-613.
- [47] L. Riboni, R. Ghidoni, A. Benevento, G. Tettamanti, Content, pattern and metabolic processing of rat-liver gangliosides during liver regeneration, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 377-382.
- [48] M.S. Toledo, E. Suzuki, K. Handa, S. Hakomori, Effect of gangliosides and tetraspanins on interaction of integrin with fibroblast growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16227-16234.
- [49] H.J.F. Maccioni, V.M. Rosalez-Fritz, M.K. Maxzud, J.L. Daniotti, J.A. Martina, Workshop: Vesicular transport in mammalian cells. Minireview. Compartmental organization of ganglioside synthesis in the Golgi complex, *Biocell* 20 (1996) 279-286.
- [50] L. Svennerholm, Ganglioside designation, in: L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus, P.F. Urban (Eds.), *Structure and function of ganglioside*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Plenum Press, New York, 1980, Vol. 125, p. 11.

Figure 1

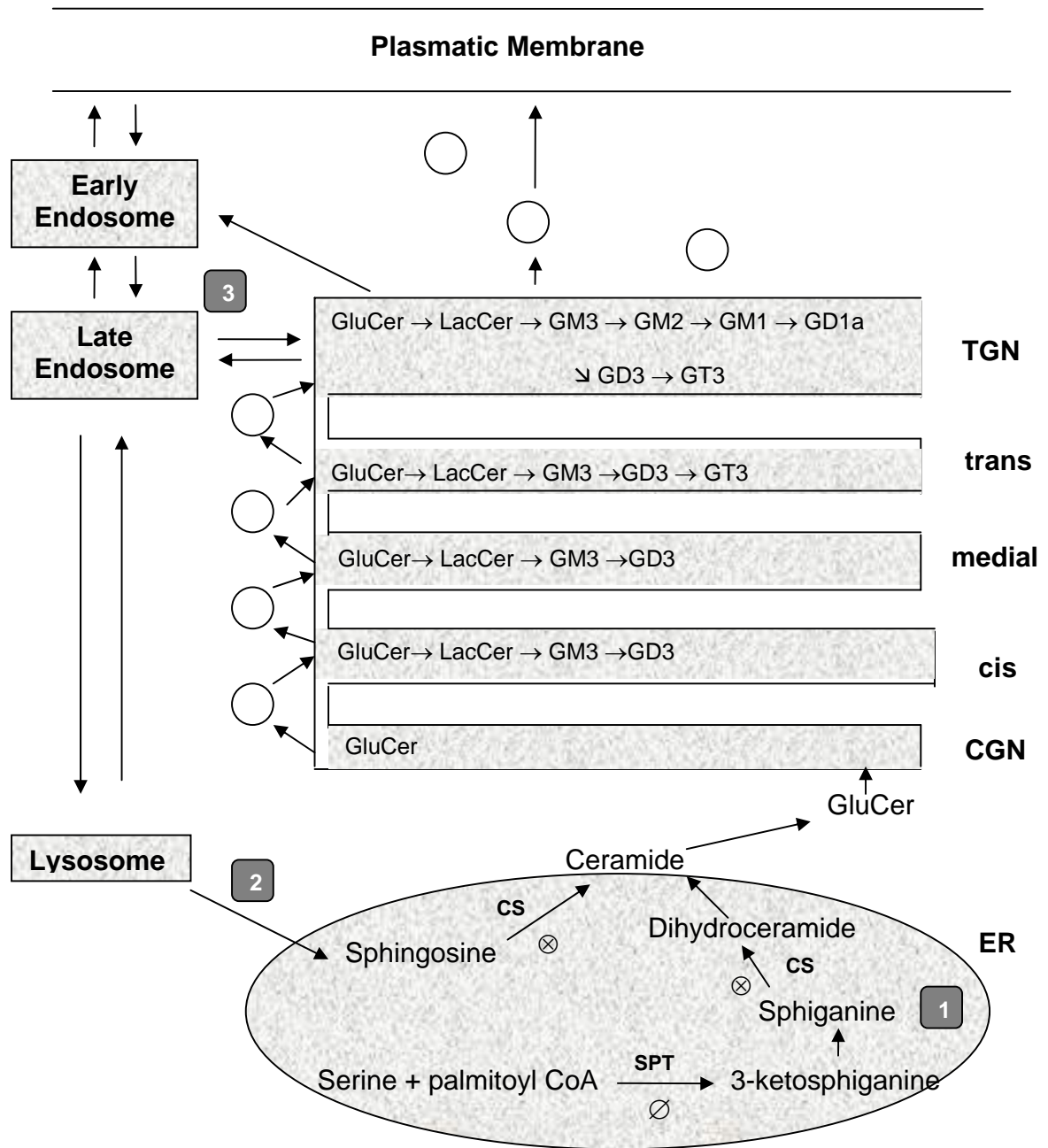


Figure 2

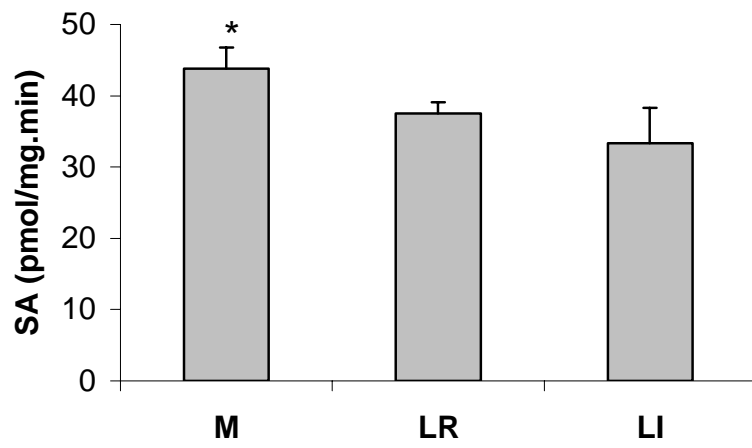


Figure 3

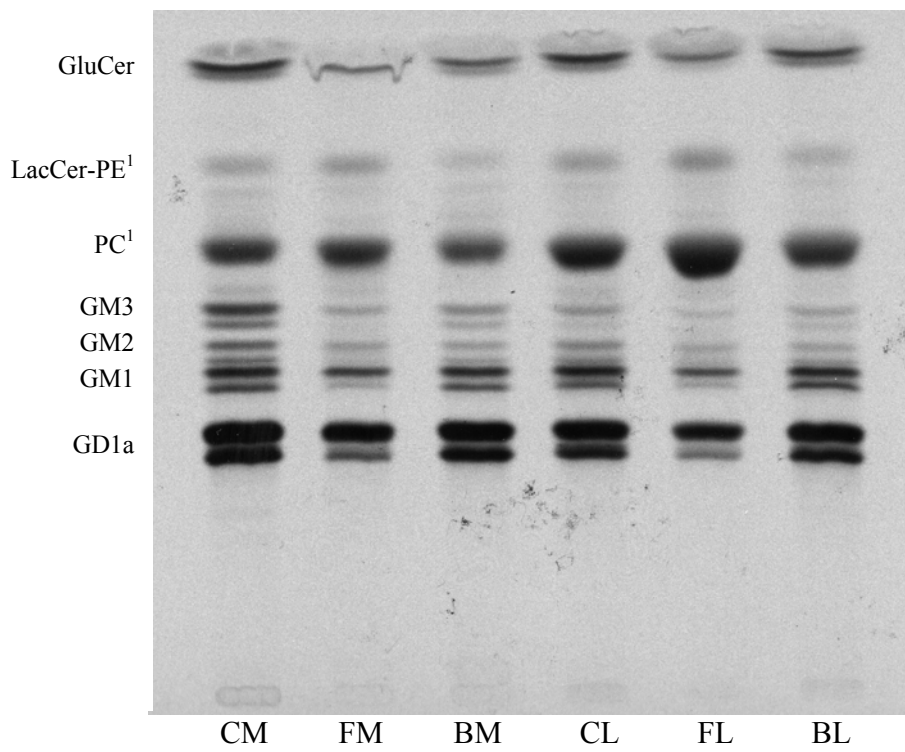
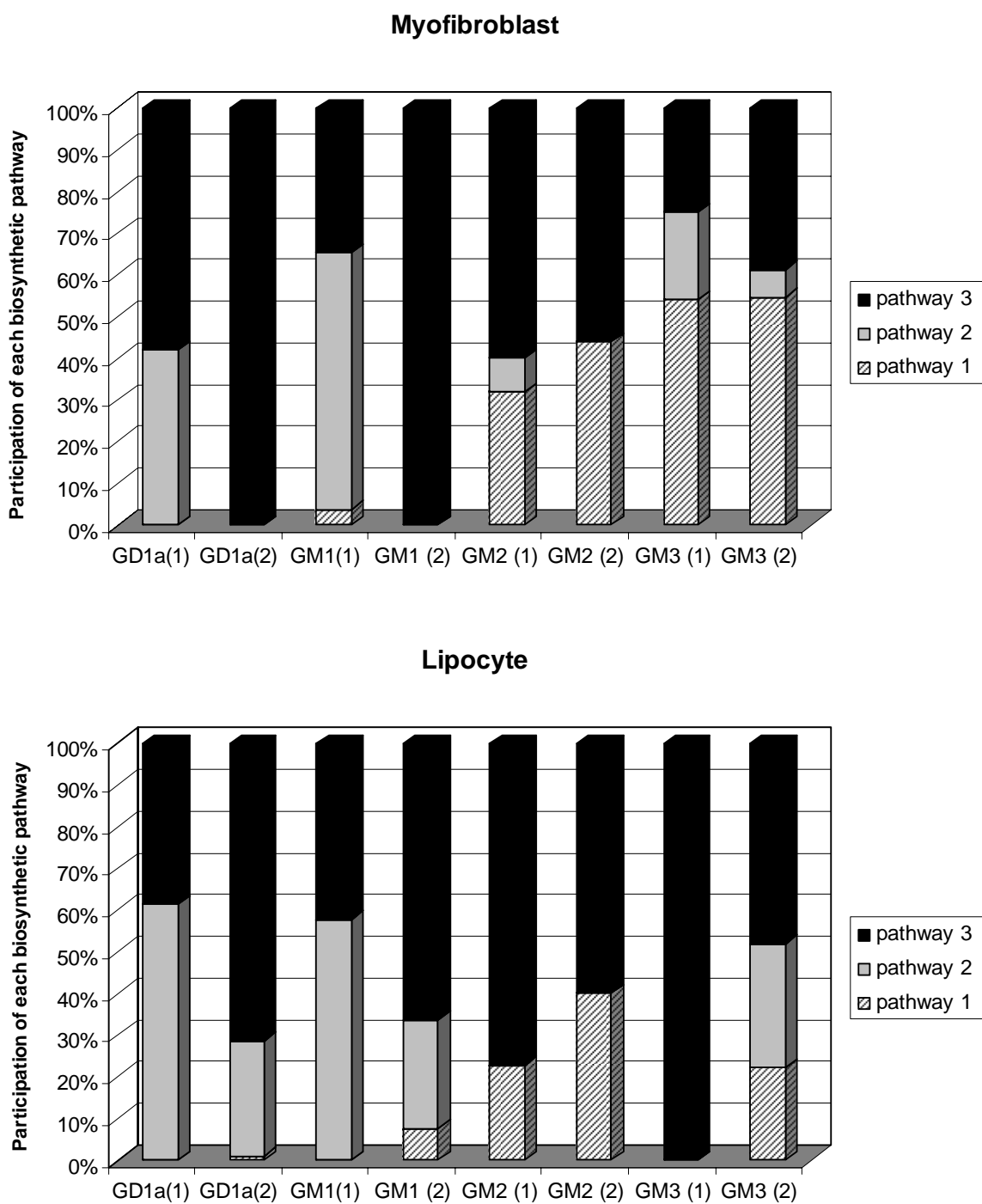


Figure 4



FIGURES LEGENDS

Figure 1. Representation of the biosynthetic pathways of gangliosides.

1 Pathway 1: *De novo* biosynthesis of dihydroceramide and ceramide from serine and palmitoyl-CoA. 2 Pathway 2: *Sphingosine recycling*: sphingosine and sphinganine produced by hydrolysis of gangliosides are reutilized for synthesis. 3 Pathway 3: *Golgi recycling*: native or partially hydrolyzed GSL recycle from endosomal pathway through the Golgi apparatus. ∅: Inhibition by b-chloroalanine of serine palmitoyltransferase (SPT). ⊗: Inhibition by fumonisin B1 of ceramide synthase (CS). ER: endoplasmic reticulum. CGN: cis Golgi network. TGN: trans Golgi network. Putative tubules and vesicles connecting different cisternae are indicated on the left side [12, 49].

Figure 2. SPT activity in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes.

M: myofibroblast; LR: lipocyte induced by retinol; LI: lipocyte induced by indomethacin.

* = M differs significantly from LR and from LI ($p < 0.05$).

Figure 3. High performance thin layer-autoradiography of D-[¹⁴C]-galactose labeled endogenous glycosphingolipids¹ from GRX cell line expressing the myofibroblast (M) or the lipocyte phenotype (L).

Each phenotype (M or L) was treated with fumonisin-B1 (FM and FL) and β -chloroalanine (BM and BL). CM and CL are the controls of each phenotype. Lipids were extracted, purified with Sep-Pack C18 cartridges and analyzed by HPTLC as described in Material and Methods. The position of co-chromatographed lipid standards are indicated. Gangliosides were named as recommended by Svennerholm [50]. ¹The glycerophospholipids, phosphatidyl-choline (PC) and phosphatidyl-ethanolamine (PE), were revealed because the samples were not submitted to alkaline hydrolysis. The present result are representative of two independent experiments.

Figure 4. Participation of the pathway 1 (*de novo*), 2 (*sphingosine recycling*) and 3 (*Golgi recycling*) in the ganglioside doublet synthesis (b1 and b2 species) from myofibroblast and lipocyte phenotypes.

Percent incorporated per pathway, calculated from combination of fumonisin B1 and β -chloro alanine inhibition data (Table I), as described in Material and Methods.

Table 1. Glycosphingolipids distribution in myofibroblast and lipocyte GRX cell phenotypes treated with fumonisin-B1 or β -chloroalanine^a.

	Myofibroblast			Lipocyte		
	CM	FM	BM	CL	FL	BL
GD1a (1)	18,2	10,5	22,9	15,9	5,1	19,4
GD1a (2)	26,8	33,3	30,9	32,0	20,3	30,9
GM1 (1)	5,2	1,8	5,0	3,4	1,2	4,6
GM1 (2)	8,0	8,4	9,2	8,9	4,6	8,4
GM2 (1)	2,5	1,5	1,7	1,9	1,5	1,5
GM2 (2)	3,4	2,9	1,9	2,7	1,6	1,3
GM3 (1)	2,8	0,7	1,3	0,7	0,6	0,8
GM3 (2)	6,2	2,4	2,8	2,8	1,0	1,9
GluCer	9,8	6,2	8,0	10,9	6,5	9,9

^a Results are expressed as % of total radioactivity incorporated and correspond to densitometric analysis of Figure 2. ¹The glycerophospholipids, phosphatidyl-choline (PC) and phosphatidyl-ethanolamine (PE), were revealed because the samples were not submitted to alkaline hydrolysis. The radioactivity up to 100% corresponds to that incorporated into phospholipid bands. The present results are representative of two independent experiments.

V. DISCUSSÃO GERAL

O modelo experimental da linhagem celular GRX permite a análise e a comparação de vários parâmetros do metabolismo das células estreladas hepáticas no fenótipo miofibroblástico versus o fenótipo lipocítico, tais como: síntese de lipídios neutros e fosfolipídios (GUARAGNA et al., 1991; 1992; CARDOSO et al., 2003) síntese de matriz extracelular e de colágeno (MARGIS et al., 1992; PINHEIRO-MARGIS et al., 1992) a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios e do retinol (VICENTE et al., 1997; 1998; FORTUNA et al., 2001); expressão dos filamentos intermediários (GUMA et al., 2001); a organização da actina (MERMELTEISN et al., 2001) e o armazenamento do beta-caroteno (MARTUCCI et al., 2004). Ambos os fenótipos apresentam gangliosídios da *série a* (GM2, GM1 e GD1a), assim como o seu precursor GM3. Todos são expressos em dupla banda em HPTLC (bandas 1 e 2, respectivamente), sendo que o fenótipo lipocítico se caracteriza por uma maior quantidade da banda 2 constituída por ceramida com ácidos graxos de cadeia mais longa (C22 e C24) (ANDRADE et al. 2003).

Também no sentido comparativo, este trabalho estuda a biossíntese das duplas de gangliosídios nos fenótipos da linhagem celular GRX determinando a atividade da serina palmitoiltransferase e avaliando a contribuição das rotas biossintéticas *de novo*, reciclagem de esfingosina e reciclagem do *Golgi*.

A SPT é uma enzima piridoxal 5'-fosfato dependente e é considerada a enzima limitante da biossíntese *de novo* dos esfingolipídios. Este processo inicia com a com a formação de 3-ceto-dihidro-esfingosina ou 3 ceto-esfinganina, a partir de palmitoil-CoA e serina, por ação da SPT (HANADA, 2003).

Nossos resultados demonstraram que a atividade da SPT é linear até 50µg de proteína microsomal (Figura IV.1); que a atividade da SPT eleva-se com o aumento do tempo de incubação (Figura IV.2); que a incorporação de serina varia linearmente até a concentração de 1mM e a partir daí ocorre uma tendência ao platô (Figura IV.3); e que variando-se a concentração

de palmitoil CoA, observa-se uma saturação da enzima pelo substrato em concentrações superiores a 0,05mM, e em concentrações superiores a 0,2mM observa-se uma tendência à inibição da enzima pelo substrato (Figura IV.4).

Com base nisto, para os experimentos de avaliação da atividade da SPT nos dois fenótipos da linhagem celular GRX, trabalhamos com um sistema de incubação composto por 45 µg de proteína microsomal, 1,2 mM de [3-¹⁴C]-serina (A.E. 10mCi/mmol), 0,16 mM de palmitoil-CoA, durante um tempo de incubação de 30 min, a 37°C, com agitação constante. MANDON e colaboradores (1991), e ROTTA e colaboradores (1997) também determinaram as condições ideais para a atividade da SPT em neurônios cerebelares e hipotálamo de ratos, respectivamente. Nossos resultados são semelhantes para as concentrações de serina e palmitoil CoA, havendo algumas variações na quantidade de proteína microsomal e no tempo de incubação, o que é decorrente do diferente tipo de tecido celular estudado. Os níveis da atividade do SPT variam entre os diferentes tipos de tecidos e células. Os níveis da atividade do SPT são, significativamente, maiores em microsomas de pulmão e de rim de ratos do que em microsomas de coração e de testículos (MERRILL Jr., et al., 1985).

A regulação da atividade da SPT pode prover um meio de modulação na síntese *de novo*. Na Figura IV.7. (minuta do artigo: Figure 2) encontramos que a atividade da SPT é, significativamente, maior no fenótipo miofibroblástico do que no fenótipo lipocítico. Isto estaria de acordo com a hipótese de que quando a necessidade para a síntese de novas membranas é limitada, como em células que não se dividem rapidamente, a maior parte da necessidade por bases esfingóides para a síntese de GSL pode ser satisfeita pela rota *de salvação* (rota 2). Quando o requerimento para a síntese de membranas na célula é grande, como em células que se dividem rapidamente, por exemplo, os miofibroblastos (RADOVAN et al., 1991), a taxa da síntese *de novo* (rota 1) pode ser aumentada (GILLARD et al, 1998).

O presente estudo fornece informações sobre a importância quantitativa das três rotas de síntese das duplas bandas dos glicosfingolipídios na linhagem celular GRX, que pode ser a adição de oses à ceramida que contém esfinganina (dihidroesfingosina) sintetizada pela rota *de novo* (rota 1), à ceramida sintetizada a partir das bases esfingóides produzidas pela (degradação) hidrólise de esfingolipídios (rota 2), ou à GSL reciclados pela rota endossomal através do *Golgi* (rota 3). Esta análise foi obtida pela incorporação de D[U-¹⁴C]galactose e pelo uso de inibidores específicos da síntese dos esfingolipídios: a rota 1 pode ser inibida pela β-cloroalanina, que é um

inibidor irreversível da SPT. As rotas 1 e 2 podem ser inibidas pela fumonisina B1, que é um homólogo estrutural da esfinganina. Este composto inibe, reversivelmente, a acilação da esfingosina e da esfinganina diminuindo a formação de ceramida [Figura IV.6 (minuta do artigo: Figure 1)] (GILLARD et al, 1996).

Foi observado que as três rotas participam da biossíntese dos GSL em ambos fenótipos da célula GRX, com algumas diferenças. Nos miofibroblastos, ambas bandas dos gangliosídios complexos (GD1a e GM1) são principalmente sintetizadas pelas rotas de reciclagem, enquanto que as bandas do GM2 e GM3 têm considerável participação da biossíntese pela rota *de novo*. Estes gangliosídios, nos lipócitos, são sintetizados por uma contribuição mínima da rota *de novo* e uma notável reciclagem pelo *Golgi* pode ser observada para a banda inferior do gangliosídio GM3 [GM3 (1)]. Estes resultados sugerem uma menor importância da síntese *de novo* nos lipócitos do que nos miofibroblastos. A maior participação da biossíntese *de novo* nos miofibroblastos está de acordo com a maior atividade da SPT detectada neste fenótipo e é consistente com o requerimento por síntese das membranas celulares em células que se dividem rapidamente, tais como miofibroblasto GRX (RADOVAN et al.,1991) e miofibroblastos C2C12 (GILLARD et al. 1998).

Além disso, a proporção entre as rotas de reciclagem pelo *Golgi* e reciclagem da *esfingosina* é variável para a maioria dos gangliosídios em ambos fenótipos da linhagem celular GRX. Por exemplo, no miofibroblasto, 40% do GD1a(1) é sintetizado pela reciclagem da *esfingosina* e 60% pelo *Golgi* enquanto no lipócito é o inverso. Isto, também, foi detectado de forma semelhante nas linhagens celulares de carcinoma adrenal humano SW13, fibroblastos de prepúcio humano, neuroblastoma NB41A3 de camundongo e glioma C6 de rato (GILLARD et al., 1996 e 1998),

Os resultados descritos agora estão de acordo com o conhecimento atual sobre a organização da biossíntese dos gangliosídios, considerando os intermediários deste processo, a localização das glicosiltransferases no sub-Golgi, e incluindo o transporte intracelular dos gangliosídios e das enzimas envolvidas (MACCIONI et al., 2002; YU et al., 2004; DEGROOTE et al., 2004).

Considerando nossos resultados prévios sobre a célula GRX, onde a razão da banda superior/inferior dos gangliosídios aumentou nos lipócitos devido à presença de mais ácidos graxos de cadeia-longa (C22, C24 ou C24:1) na estrutura das ceramidas dos lipócitos do que nas

ceramidas dos miofibroblastos (ANDRADE et al., 2003), e os presentes dados das rotas biossintéticas dos gangliosídeos, nos fazem pensar na possibilidade da ação de transacilases, como descrito para fosfolipídios (YAMASHITA et al., 1997). A performance destas enzimas poderia mudar os ácidos graxos de cadeia-longa da porção ceramida dos GSL, e poderia justificar um provável *pool* de ceramida precursor distinto para sua síntese, transporte intra-celular e segregação em membranas (KANNAGI et al., 1982, DEGROOTE et al., 2004). Além disso, poderia explicar, pelo menos em parte, o maior conteúdo da banda superior no fenótipo lipocítico.

Por outro lado, das três rotas de síntese, a reciclagem através do Golgi é a única que envolve glicosilação direta sem afetar a qualidade do ácido graxo presente nos gangliosídeos que chegam a esta organela. Este aspecto simplifica a análise dos dados obtidos sobre esta rota, os quais podem fornecer uma informação extra sobre a seletividade do transporte endocítico de espécies particulares de GSL. Por exemplo, no fenótipo lipocítico o GM3(1) provém, exclusivamente, da reciclagem pelo Golgi. Isto, no mínimo, implicaria que o precursor GlcCer ou LacCer seja seletivamente transportado ao complexo de Golgi para sua reglicosilação. Posteriormente, o GM3(1) seria transportado à superfície celular e não seria utilizado como substrato no Golgi. Outro exemplo interessante é para o GM1(2) e para o GD1a(2) do fenótipo miofibroblástico os quais provêm, exclusivamente, da reciclagem através do Golgi. Curiosamente, os gangliosídeos mais simples de ambos fenótipos provêm da rota *de novo* e os mais complexos das rotas de reciclagem. É evidente que uma fração dos gangliosídeos simples transita pelo complexo de Golgi sem posterior glicosilação para chegar à membrana plasmática, enquanto a síntese dos gangliosídeos complexos requer reciclagem pelo Golgi ou pelo lisossoma. O GM3(2) e o GM2(2) são, seletivamente, transportados ao Golgi para serem reglicosilados a GM1, do qual parte é transportada à superfície da membrana plasmática e parte é sialilado para dar GD1a(2) (MACCIONI et al., 1999; 2002; MARKS e PAGANO, 2003).

Interessantemente, a contribuição da rota *de novo* para a síntese do gangliosídeo GM3 no miofibroblasto, apesar deste gangliosídeo ser um componente relativamente menor, poderia ser relevante, considerando a modulação deste gangliosídeo na proliferação, migração dos miofibroblastos dentro do tecido hepático regenerado ou fibroso (RIBONI et al., 1990) e sua forte influência na interação entre integrina e o receptor de fator de crescimento fibroblástico (TOLEDO et al., 2005).

A associação dos resultados da atividade da SPT e da análise da incorporação de galactose radioativa nos gangliosídeos na presença dos inibidores da síntese dos esfingolípídios sugere que os fenótipos miofibroblástico e lipocítico da linhagem celular GRX apresentam uma relação diferente entre as três rotas biossintéticas dos GSL, o poderia se refletir no seu comportamento celular.

Concluindo, como os gangliosídeos estão relacionados com diferenciação, proliferação, migração, interação célula-célula e transdução de sinal, processos que estão intimamente associados à composição e à estrutura da membrana plasmática, sugere-se que as diferenças metabólicas encontradas entre os dois fenótipos da linhagem GRX, para a biossíntese destes compostos, sejam adicionadas às demais evidências das distintas funções exercidas por estes dois tipos celulares, que mimetizam a célula estrelada na fisiopatologia hepática.

VI. CONCLUSÕES

- Os parâmetros cinéticos determinados para o estudo da atividade da SPT na linhagem celular GRX são: 45 µg de proteína microsomal, 1,2 mM de [3-¹⁴C]-serina (A.E. 10mCi/mmol), 0,16 mM de palmitoil-CoA , um tempo de incubação de 30 min, a 37°C, com agitação constante.
- A atividade da SPT é maior no fenótipo miofibroblástico. Isto concorda com o fenômeno da síntese de novas membranas nas células em processo rápida proliferação como os miofibroblastos da linhagem celular GRX.
- As três rotas, 1 (de novo), 2 (reciclagem da *esfingosina*) e 3 (reciclagem através *Golgi*), participam da biossíntese dos GSL nos dois fenótipos, porém, com algumas diferenças.
- Nos miofibroblastos, os *doublets* dos gangliosídios complexos (GD1a e GM1) são sintetizados pelas rotas de reciclagem da *esfingosina* e através *Golgi*, enquanto que as bandas do GM2 e do GM3 apresentam uma considerável participação da biossíntese *de novo*.
- Nos lipócitos, as rotas mais importantes são as de reciclagem, entretanto, ambas bandas do GM2 e a b2 do GM3 apresentam uma considerável participação da biossíntese *de novo*. Porém, esta rota revela uma menor importância nos lipócitos quando comparada aos miofibroblastos, o que está de acordo com a menor atividade da SPT encontrada naquele fenótipo.

- Miofibroblastos e lipócitos poderiam usar grupos precursores de ceramida distintos para a síntese dos seus GSL o que corrobora com dados anteriores do laboratório, os quais mostraram nos lipócitos predominam as ceramidas com ácidos graxos de cadeias mais longas e com maior grau de insaturação.

- Como os gangliosídios estão relacionados com diferenciação, proliferação, migração, interação célula-célula e transdução de sinal, processos que estão intimamente associados à composição e à estrutura da membrana plasmática, sugere-se que as diferenças metabólicas encontradas entre os dois fenótipos da linhagem GRX, para a biossíntese destes compostos, sejam adicionadas às demais evidências das distintas funções exercidas por estes dois tipos celulares, que mimetizam o comportamento célula estrelada nos processos fisiopatológicos hepáticos.

VII. REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.M., TRINDADE, V.M., CARDOSO, C.C., ZIULKOSKI, A.L., TRUGO, L.C., GUARAGNA, R.M., BOROJEVIC, R., GUMA, F.C. Changes of sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88(3) p. 533-544, 2003.

BASU, S., BASU, M. Expression of glycosphingolipid glycosyltransferases in development and transformation. In: HOROWITZ, M.I. (ed.) **The glyconjugates**. New York, Academic Press, v.3 p.265-275, 1982.

BASU, M., KELLY, P., GIRZADAS, M., LI, Z., BASU, S. Properties of animal ceramide glycanases. **Methods in Enzymology**, v. 311 p. 287-97. 2000.

BASU, S., BASU, M., DASTGHEIB, S., HAWES, J.W. Biosynthesis and regulation of glycosphingolipids. In: **Comprehensive Natural Products Chemistry**. Edited by Barton D, Nakanishi K, Meth-Cohen O, v. 3 (edited by Pinto BM) (Pergamon Press, New York), p. 107-128, 1999.

BASU, S., DAS, K., BASU, M. Glycosyltransferases in glycosphingolipid biosynthesis. In: **Oligosaccharides in chemistry and biology—A comprehensive handbook**. Edited by Ernst B, Sinay P, Hart G (Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany) p. 329-347, 2000.

BASU, S., KAUFMAN, B., ROSEMAN, S. Enzymatic synthesis of ceramide glucose and ceramide lactose by glycosyltransferase from embryonic chicken brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243 p. 5802-5804, 1968.

BLANER, W.S., OLSON, J.A. Retinol and Retinoic acid metabolism. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (Ed) **The Retinoids – Biology, Chemistry and Medicine**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 5, p. 229.

BLOMHOFF, R., WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 5 p. 271-277, 1991.

BOROJEVIC, R. GUARAGNA, R.M., MARGIS, R., DUTRA H.S. *In vitro* induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 26 p. 361-368, 1990.

BOROJEVIC, R., GUARAGNA, R.M., VICENTE, C., MARGIS, R., MARGIS, M.P., SILVA, L.C. *In vitro* conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocytes (Ito cells). In: Wisse, E., Knook, D.L., McCuskey, R.S. (Ed) **Cells of the Hepatic Sinusoid**. The Kupffer Cell Foundation, v. 3 p. 249-252, 1991.

BOROJEVIC, R., MONTEIRO, A.N., VINHAS, S.A., DOMONT, G.B., MOURAO, P.A., EMONARD, H., GRIMALDI, G.JR., GRIMAUD, J.A. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. ***In vitro Cellular and Developmental Biology***, v. 21 p. 382-390, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72 p. 248-254, 1976.

BRAESCO, V.A., DODEMAN, I., DELPAL, S., GOUABAU, M.C.A., PARTIER, A., BOREL, P., GROLIER, P. Vitamin A contained in the lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1259 p. 271-276, 1995.

BRAUN, P.E., MORELL, P., RADIN, N.S. Synthesis of C18- and C20-dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparations from mouse brain. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 245 p. 335-341, 1970.

BRAUN, P.E., SNELL, E.E. Biosynthesis of sphingolipid bases. II. Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 243 p. 3775-3783, 1968.

CARDOSO, C.C., PAVIANI, E.R., CRUZ, L.A., GUMA, F.C., BOROJEVIC, R., GUARAGNA, R.M. Effect of pentoxifylline on arachidonic acid metabolism, neutral lipid synthesis and accumulation during induction of the lipocyte phenotype by retinol in murine hepatic stellate cell. ***Molecular and Cellular Biochemistry***, v. 254 p. 37-46, 2003.

CARLONI, V., ROMANELLI, R.G., PINZANI, M., LAFFI, G., GENTILINI, P. Expression and function of integrin receptors for collagen lamin in cultured human hepatic stellate cells. ***Gastroenterology***, v. 110 p. 2237-1136, 1996.

CHANG, E.B., SITRIN, M.D., BLACK, P.P. ***Gastrointestinal, Hepatobiliary and Nutritional Physiology***. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996.

DANIOTTI, J.L., MARTINA, J.A., GIRAUDO, C.G., ZURITA, A.R., MACCIONI, H.J. GM3 alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase): Protein characterization and sub-Golgi location in CHO-K1 cells, ***Journal of Neurochemistry***, v. 74, 1711-1720, 2000.

DEGROOTE S., WOLTHOORN J., VAN MEER G. The cell biology of glycosphingolipids, ***Seminars in cell & developmental biology***. v. 15 p. 375-387, 2004.

DICKSON, R.C., LESTER, R.L., NAGIEC, M.M. Serine palmitoyltransferase. ***Methods in Enzymology***, v. 311 p. 3-9, 2000.

FORTUNA, V.A., MARTUCCI, R.B., TRUGO, L.C., BOROJEVIC, R. Hepatic stellate cells uptake of retinol associated with retinol-binding protein or with bovine serum albumin. ***Journal of Cellular Biochemistry***, v. 90 p. 792-805, 2003.

- FORTUNA, V.A., TRUGO, L.C., BOROJEVIC, R. Acyl-CoA: retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) activation during the lipocyte phenotype induction in hepatic stellate cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12 p. 610-621, 2001.
- FRIEDMAN, S. Cytokines and Fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, v. 19 p. 129-140, 1999.
- FRIEDMAN, S.L. The cellular basis of hepatic fibrosis – mechanisms and treatment strategies. **The New England Journal of Medicine**, v. 25 p. 1828-1835, 1993.
- FURUSATO, M., SUEYOSHI, N., MITSUTAKE, S., SAKAGUCHI, K., KITA, K., OKINO, N., ICHINOSE, S., OMORI, A., ITO, M. Molecular cloning and characterization of sphingolipid ceramide N-deacylase from a marine bacterium. **Shewanella alga G8**, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p. 17300–17307, 2002.
- FUTERMAN, A.H., STIEGER, B., HUBBARD, A.L., PAGANO, R.E. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265 p. 8650-8657, 1990.
- GEELLEN, M.J., BEYNEN, A.C. Consumption of olive oil has opposite effects on plasma total cholesterol and sphingomyelin concentrations in rats. **The British Journal of Nutrition**, v. 83 p. 541–547, 2000.
- GILLARD, B.K., CLEMENT, R.G., MARCUS, D.M. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in *de novo* and recycling pathways. **Glycobiology**, v. 8 p. 885-890, 1998.
- GILLARD, B.K., HARRELL, R.G., MARCUS, D.M. Pathways of glycosphingolipid biosynthesis in SW13 cells in the presence and absence of vimentin intermediate filaments. **Glycobiology**, v. 6 p. 33-42, 1996.
- GIRAUDO, C.G., ROSALES FRITZ V.M., MACCIONI, H.J. GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-golgi network of CHO-K1 cells. **The Biochemical Journal**, v. 342, 633–640, 1999.
- GOLLA, K., EPSTEIN, J.B., ROBERT J. CABAY, R.J. Liver disease: Current perspectives on medical and dental management. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 98 p. 516-21, 2004.
- GRESSNER, A.M., The cell biology of liver fibrogenesis – an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myobibroblast. **Cell & Tissue Research**, v. 292 p. 447-452, 1998.
- GUARAGNA, R.M., TRUGO, L., BOROJEVIC, R. Neutral lipids synthesis and accumulation during *in vitro* induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1085 p. 29-34, 1991.
- GUARAGNA, R.M., TRUGO, L., BOROJEVIC, R. Phospholipid modifications during conversion of hepatic myofibroblasts into lipocytes (Ito-cells). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1128 p. 237-243, 1992.

GUMA, F.C.R., MELLO, T.G., MERMELSTEIN, C.S., FORTUNA, V.A., WOFCHUK, S.T., GOTTFRIED, C., GUARAGNA, R.M., COSTA, M.L., BOROJEVIC, R. Intermediate filaments modulation in an in vitro model of the hepatic stellate cell activation or conversion into the lipocyte phenotype. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 79 p. 409-417, 2001.

HAKOMORI, S. Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions. **Biochemical Society Transactions**, (Pt 3)(3) p. 583-595, 1993.

HAKOMORI, S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. **Current Opinion in Hematology**, v. 10 p. 16-24, 2003.

HANADA, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1632 p. 16-30, 2003.

HANADA, K., HARA, T., NISHIJIMA, M., KUGE, O., DICKSON, R.C., NAGIEC, M.M. A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the first step in sphingolipid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272 p. 32108-31114, 1997.

HANADA, K., NISHIJIMA, M., FUJITA, T., KOBAYASHI, S. Specificity of inhibitors of serine palmitoyltransferase (SPT), a key enzyme in sphingolipid biosynthesis, in intact cells. A novel evaluation system using an SPT-defective mammalian cell mutant. **Biochemical Pharmacology**, v. 59 p. 1211-1216, 2000.

HANNUN, Y.A., LINARDIC, C.M. Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1154 p. 223-236, 1993.

HAUTEKEETE, M.L., GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 430 p. 195-207, 1997.

HIRABAYASHI, Y., KIMURA, M., MATSUMOTO, M., YAMAMOTO, K., KADOWAKI, S., TOCHIKURA, T. A novel glycosphingolipid hydrolyzing enzyme, glycosphingolipid ceramide deacylase, which cleaves the linkage between the fatty acid and sphingosine base in glycosphingolipids. **Journal of Biochemistry**, v. 103 p. 1-4, 1988.

HOLLERAN, W.M., WILLIAMS, M.L., GAO, W.N., ELIAS, P.M. Serine-palmitoyl transferase activity in cultured human keratinocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 31 p.1655-1661, 1990.

HOLTHUIS, J.C., POMORSKI, T., RAGGERS, R.J., SPRONG, H., VAB MEER, G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. **Physiological Reviews**, v. 81 p. 1689-1723, 2001.

HUWILER, A., KOLTER, T., PFEILSCHIFTER, J., SANDHOFF K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1485 p. 63-99, 2000.

- IKUSHIRO, H., HAYASHI, H., KAGAMIYAMA, H. Reactions of serine palmitoyltransferase with serine and molecular mechanisms of the actions of serine derivatives as inhibitors. **Biochemistry**, v. 43 p.1082-1092, 2004.
- ITO, M., YAMAGATA, T. A novel glycosphingolipid-degrading enzyme cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261 p. 14278–14282, 1986.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8.Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.
- KANNAGI, R., NUDELMAN E., HAKOMORI, S. Possible role of ceramide in defining structure and function of membrane glycolipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 79 p. 3470-3474, 1982.
- KEENAN, T.W., MORRE, J.D., BASU, S. Ganglioside biosynthesis: Concentration of glycosphingolipid glycosyltransferase in Golgi apparatus from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249 p. 310, 1974.
- KOK, J.W., ESKELINEN, S., HOECKSTRA, K., HOECKSTRA, D. Salvage of glucosylceramide by recycling after internalization along the pathway of receptor-mediated endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86 p. 9896–9900, 1989.
- KOK, J.W., HOECKSTRA, K., ESKELINEN, S., HOECKSTRA, D. Recycling pathways of glucosylceramide in BH cells: Distinct involvement of early and late endosomes. **Journal of Cell Science**, v. 103 p. 1139–1152, 1992.
- KOLTER, T., PROIA, R.L., SANDHOFF, K., Combinational ganglioside biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p. 25859–25862, 2002.
- LAKE, B.D., GOODWIN, H.J. Lipids. In: **Chromatographic and Eletrophoretic Techniques, Vol. 1, Paper and Thin Layer Chromatography**. Smith, I; Seakins, J.W.T. eds. William Heinemann Medical Bookes Ltd., London, UK, p. 345-366, 1976.
- LEV, M., MILFORD, A.F. The 3-ketodihydrosphingosine synthetase of *Bacteroides melaninogenicus*: partial purification and properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 212 p. 424-431, 1981.
- LLOYD, K.O., FURUKAWA, K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. **Glycoconjugate Journal**, v. 15 p. 627-636, 1998.
- LONGO, C.A., TYLER, D., MALLAMPALLI, R.K. Sphingomyelin metabolism is developmentally regulated in rat lung, Am. J. Respir. **Cellular and Molecular Biology**, v. 16 p. 605–612, 1997.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193 p. 265-275, 1951.
- LYNCH, D.V., FAIRFIELD, S.R. Sphingolipid Long-Chain Base Synthesis in Plants (Characterization of Serine Palmitoyltransferase Activity in Squash Fruit Microsomes). **Plant Physiology**, v. 103 p. 1421-1429, 1993.
- MACCIONI, H.J.F, ROSALEZ-FRITZ, V.M., MAXZUD, M.K., DANIOTTI, J.L., MARTINA, J.A. Workshop: Vesicular transport in mammalian cells. Minireview. Compartmental organization of ganglioside synthesis in the Golgi complex. **Biocell**, v. 20 p. 279- 286, 1996.
- MACCIONI, H.J.F., DANIOTTI, J.L., MARTINA, J.A. Organisation of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1437 p. 101–118, 1999.
- MACCIONI, H.J.F., GIRAUDO, C.G., DANIOTTI, J.L. Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. **Neurochemical Research**, v. 27 p. 629– 636, 2002.
- MANCINI, G.M.S., de JONGE, H.R., GALJAARD, H., VERHEIJEN, F.W. Characterization of proton-driven carrier of sialic acid in the lysosomal membrane. Evidence for a group specific transport system for acidic monosaccharides **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264 p. 15247–1525, 1989.
- MANDON, E.C., EHSES, I., ROTHER, J., van ECHTEN, G., SANDHOFF, K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267 p. 11144-11148, 1992.
- MANDON, E.C., van ECHTEN, G., BIRK, R., SCHMIDT, R.R., SANDHOFF, K. Sphingolipid biosynthesis in cultured neurons. Down-regulation of serine palmitoyltransferase by sphingoid bases. **European Journal of Biochemistry**, v. 198 p. 667-674, 1991.
- MARGIS, R., PINHEIRO-MARGIS, M., DA SILVA, L.C., BOROJEVIC, R. Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 73 p. 125-135, 1992.
- MARGIS, R., BOROJEVIC, R. Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a rat liver tissue cell line (GRX). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1011 p. 1-5, 1989.
- MARKS, D.L., PAGANO, R.E. Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease. **Trends in Cell Biology**, v.12 p. 605-613, 2002.
- MARTUCCI, R.B., ZIULKOSKI, A.L., FORTUNA, V.A., GUARAGNA, R.M., GUMA, F.C., TRUGO, L.C., BOROJEVIC, R. Beta-carotene storage, conversion to retinoic acid, and induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. **Journal Cellular Biochemistry**, v. 92 p. 414-423, 2004

- MEDLOCK, K.A., MERRILL, A.H.Jr. Inhibition of serine palmitoyltransferase in vitro and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by beta-chloroalanine. **Biochemistry**, v. 27 p.7079-7084, 1988.
- MERMELSTEIN, C.S., GUMA, F.C., MELLO, T.G., FORTUNA, V.A., GUARAGNA, R.M., COSTA, M.L., BOROJEVIC, R. Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells: reorganisation of the actin cytoskeleton. **Cell and Tissue Research**, v. 306 p. 75-83, 2001.
- MERRILL A.H.Jr. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23 p. 83-104, 1991.
- MERRILL A.H.Jr., NIXON, D.W., WILLIAMS, R.D. Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. **Journal of Lipid Research**, v. 26 p. 617- 622, 1985.
- MERRILL A.H.Jr., SCHMELZ, E.M., DILLEHAY, D.L., SPIEGEL, S., SHAYMAN, J.A., SCHROEDER, J.J., RILEY, R.T., VOSS, K.A., WANG, E. Sphingolipids-The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 142 p. 208-225, 1997.
- MERRILL, A.H.Jr., VAN ECHTEN, G., WANG, E., SANDHOFF, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268 p. 27299-27306, 1993a
- MERRILL, A.H.Jr., WANG, E., GILCHRIST, D.G., RILEY, R.T. Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis, **Advances in lipid research**, v. 26 p. 215-234, 1993b.
- MERRILL, A.H.Jr, WANG, E. Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261 p. 3764-3769, 1986.
- MERRILL, A.H.Jr., JONES, D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1044 p. 1-12, 1990.
- MERRILL, A.H.Jr., Sphingosine and other long-chain bases that alter cell behavior. **Current Topics in Membranes**, v. 40 p. 361-386. 1994.
- MERRILL, A.H.Jr., WANG, E. Enzymes of ceramide biosynthesis. **Methods in Enzymology**, v. 209 p. 427-431, 1992.
- MONTEIRO A.N.A., BOROJEVIC, R. Interaction of human liver connective tissue cells, skin, fibroblasts and smooth muscle cells with collagen gels. **Hepatology**, v. 7 p. 665-671, 1987a.
- MONTEIRO A.N.A., BOROJEVIC, R. *In vitro* formation of fibrous septa by liver connective tissue cells. **In vitro Cellular Developmental Biology**, v. 23 p. 10-14, 1987b.

MONTI, E., PAPINI, N., CROCI, G.L., TRINGALI, C., ANASTASIA, L., MIYAGI, T., PRETI, A., TETTAMANTI, G., PRINETTI, A., SONNINO, S., VENERANDO, B. *In vivo* activity of Mm Neu3, a plasma membrane associated sialidase, Abstract, 6th International Symposium on biochemical roles of eukariotic cell surface macromolecules, Kolkata (India), January 16–18, 2003.

NAGIEC, M.M., BALTISBERGER, J.A., WELLS, G.B., LESTER, R.L., DICKSON, R.C. The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of America**, v. 91 p.7899-7902, 1994.

NAKAMURA, K., HANDA, S. Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates. **Analytical Biochemistry**, v. 142 p. 406-410, 1984.

NANNI, G., CANEPA, C., CAU, A. Dolichol and vitamin A content in rat liver ito (perisinusoidal) cells. **Cell Life Sciences**, v. 60 p. 21-28, 1997.

NIKI, T., PEKNI, M., HELLEMANS, K., BLESER, P.J., VAN DE BERG, K., VAEYENS, F., QUARTIER, E., SCHUIT, F., GREETS, A. Class VI Intermediate Filament Protein Nestin in Induced During Activation of Rat Hepatic Stellate Cells. **Hepatology**, v. 29 p. 520-527, 1999.

NOMUROVA, T., TAKIZAWA, M., AOKI, J., ARAI, H., INOUE, K., WAKISAKA, E., YOSHIZUKA, N., IMOKAWA, G., DOHMAE, N., TAKIO, K., HATTORI, M., MATSUO, N. Purification, cDNA cloning, and expression of UDPGal:Glucosylceramide, β -1,4-galactosyltransferase from rat brain, **The Journal of Biological Chemistry** v. 273 p. 13570–13577, 1998.

NORES, G.A., MITZUMARI, R.K., KREMER, D.M. Chromatographic tank designed to obtain highly reproducible high-performance thin-layer chromatograms of gangliosides and neutral glycosphingolipids. **Journal Chromatography A**, v. 686 p. 155-157, 1994.

PINHEIRO-MARGIS, M., MARGIS, R., BOROJEIC, R. Collagen sybthesis in a established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 56 p. 108-118, 1992.

PINZANI, M., GENTILINI, P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 19 p. 397-410, 1999.

PRETI, A., FIORILLI, A., LOMBARDO, A., CAIMI, L., TETTAMANTI, G. Occurrence of sialyltransferase activity in the synaptosomal membranes prepared from calf brain cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 35 p. 281–296, 1980.

RADOVAN, R., GURAGNA, R.M., MARGIS, R., MARGIS, M.P., VICENTE, C.P., da SILVA, L.C. *In vitro* conversion of a hepatic myofibroblast cell line GRX into lipocytes (Ito cells), In: E. Wisse, D.L.Knook, R.S. McCuskey (Eds.), **Cells of the Hepatic Sinusoid, Kupffer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands**, v. 3 p. 249-252, 1991.

- RENLUND, M., TIETZE, F., GAHLW, A., Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. **Science**, v. **232** p. 759–762, 1986.
- RIBONI, L., GHIDONI, R., BENEVENTO, A., TETTAMANTI, G. Content, pattern and metabolic processing of rat-liver gangliosides during liver regeneration. **European Journal of Biochemistry**, v. 194 p. 377-382, 1990.
- RIBONI, L., BASSI, R., CAMINITI, A., PRINETTI, A., VIANI, P., TETTAMANTI, G. Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma Neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects. **In: Sphingolipids as Signalling Modulators in the Nervous System**, Ledeen BW, Hakomori SI, Yates AJ, Schneider YS, Yu RK, Ann NY Acad Sci, v.. 845 p. 46–56, 1998.
- RIBONI, L., VIANI, P., TETTAMANTI, G. Estimating sphingolipid metabolism and trafficking in cultured cells using radiolabeled compounds. **In: Methods in Enzymology**. Edited by Merrill Jr. AH, Hannun YA, (Academic Press, San Diego) v. 311 p. 656–682, 1999.
- ROCKEY, D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cells contractility, endothelin, and nitric oxide. **Hepatology**, v.25 p. 2-5, 1997.
- ROTTA, L.N., DA SILVA, C.G., PERRY, M.L., TRINDADE, V.M. Undernutrition decreases serine palmitoyltransferase activity in developing rat hypothalamus. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 43 p. 152–158, 1999.
- SANDHOFF, K., KOLTER, T. Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358 p.847–861, 2003.
- SENOO, H. Structure and function of hepatic stellate cells. **Medical Electron Microscopy**, v. 37 p. 3-15, 2004.
- SOFER, A., SCHWARZMANN, G., FUTERMAN, A.H., The internalization of a short acyl chain analogue of ganglioside GM1 in polarized neurons. **Journal of Cell Science**, v. 109 p. 2111–2119, 1996.
- SUEMATSU, M., WAKABAYASHI, Y., ISHIMURA, Y. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. **Cardiovascular Research**, v. 32 p. 679-686, 1996.
- SUNDERAM, K.S., LEV, M. Purification and activation of brain sulfotransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267 p. 24041–24044, 1992.
- SUNG, C.C., PEARL, D.K., COONS, S.W., SCHEITHAUER, B.W., JOHNSON, P.C., ZHENG, M., YATES, A.J. Gangliosides as diagnostic markers of human astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors. **Cancer**, v.74 p.3010-3022, 1994.

SVENNERHOLM, L. Ganglioside designation. **In: Structure and Function of Ganglioside.** Edited by Svennerholm L, Mandel P, Dreyfus H, Urban PF, Adv. Exp. Med. Biol. (Plenum Press, New York), v. 125 p. 11, 1980.

SVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 24 p. 604-611, 1957.

TETTAMANTI, G. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. **Glycoconjugate Journal**, v. 20 p. 301-317, 2004.

TETTAMANTI, G., GHIDONI, R., SONNINO, S., CHIGORNO, V., VENERANDO, B., GIULIANI, A., FIORILLI, A. Approaches in the study of ganglioside metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.174 p. 273-284, 1984.

TOLEDO, M.S., SUZUKI, E., HANDA, K., HAKOMORI, S., Effect of gangliosides and tetraspanins on interaction of integrin with fibroblast growth factor receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.14 [Epub ahead of print], 2005.

Van ECHTEN, G., BIRK, R., BRENNER-WEISS, G., SCHMIDT, R.R., SANDHOFF, K. Modulation of sphingolipid biosynthesis in primary cultured neurons by long chain bases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265 p. 9333-9339, 1990.

VICENTE, C.P., GUARAGNA, R.M., BOROJEVIC, R. Lipid metabolism during in vitro induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 168 p. 31-39, 1997.

VICENTE, C., FORTUNA, V.A., MARGIS, R., TRUGO, L., BOROJEVIC, R. Retinol uptake and metabolism, and cellular retinol binding protein expression in a *in vitro* model of hepatic stellate cells. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 187 p. 11-21, 1998.

WEISS, B., STOFFEL, W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase – cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 249 p. 239-247, 1997.

WILLIAMS, M.A., McCLUER, R.H. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. **Journal of Neurochemistry**, v. 35 p. 266-269, 1980.

WILLIAMS, R.D., WANG, E., MERRILL A.H.Jr. Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase activity in rat liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 228(1) p. 282-291, 1984.

WISSE, E., GREETS, A., BOUWENS, L., BOSSUYT, H., VANDERKERKEN, K., VAN GOETHEM, F. Cells of the Hepatic Sinusoid. In: Wisse, E., Knook, D.L., Decker, K. (Ed) **Cells of the Hepatic Sinusoid.** The Kupffer Cell Foundation, v. 2 p. 1-9, 1989.

YAMASHITA A., SUGIURA T., WAKU K. Acyltransferases and acylases involved in fatty acid remodeling of phospholipid and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. **Journal of biochemistry** (Tokyo) v. 122 p. 1-16, 1997.

YASUDA, S., NISHIJIMA, M., HANADA, K. Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278 p. 4176–4183, 2003.

YOMOTO, S., YOMOTO, K., YAMAMOTO, M. Effects of retinoic acid on Ito cells (fat-storing cells) in vitamin A-deficient rats. In: Wisse, E., Knook, D.L., Decker, K. (Ed) **Cells of the Hepatic Sinusoid. Cells of the Hepatic Sinusoid** v. 2 p. 33-38, 1989.

YU, R.K., BIEBERICH, E., XIA, T., ZENG, G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. **Journal of Lipid Research**, v. 45 p. 783-793, 2004.

ZHOU, X., MURPHY, F.R., EHDU, N., ZHANG, J., IREDALE, J.P., BENYON, R.C. Engagement of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Regulates Proliferation and Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279 p. 23996–24006, 2004.

ZIULKOSKI, A.L., ZIMMER, A.R., ZANETTINI, J.S., TRUGO, L.C., GUMA, F.C. Synthesis and transport of different sphingomyelin species in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 219 p. 57-64, 2001.

VIII. ANEXO - Regras da revista: *Experimental Cell Research*

Guide for Authors

Experimental Cell Research (ECR) is dedicated to publishing manuscripts that significantly advance our understanding of cell and molecular biology. Examples of areas of interest to *ECR* are the cell cycle; gene regulation; chromatin; subcellular organization; signal transduction; nuclear import-export; intracellular trafficking; programmed cell death; the dynamics and function of the cytoskeleton, cell membrane, and extracellular matrix; the biology of meiosis and mitosis; cell motility and migration; mechanisms of cellular growth control and differentiation; and cell-cell interaction between cells in tissues or in culture. Manuscripts in the area of cancer research, particularly those that address fundamental aspects of cell and molecular biology, are also welcomed. Reports describing new experimental techniques and methods or of theoretical work having a direct bearing on experimental approaches are also appropriate for inclusion in the journal. Experimental manuscripts will be given the highest priority and can range from the subcellular to the organism level, including work on transgenic animals. Purely descriptive work, including descriptions of RNA or protein expression patterns, is given lower priority but can be accepted if it provides important new or unexpected information.

Acceptance of manuscripts will be based on scientific excellence and priority as judged by editors and reviewers, on relevance to the central themes of the journal, and on the interest of the results to a broad readership of cell and molecular biology. A manuscript of high intrinsic quality may be returned if it seems better suited to a more specialized journal. Also, manuscripts that present preliminary observations or an incremental increase in understanding are not encouraged.

Submission of Manuscripts

It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear and grammatical English and be submitted to the *Experimental Cell Research* Web site at <http://ees.elsevier.com/yexcr>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Minimal exceptions will be allowed. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Complete instructions are available at the submission Web site. If you are unable to provide an electronic version, please contact the editorial office prior to submission by e-mail: ecr@elsevier.com; telephone: (619) 699-6750; or fax: (619) 699-6700.

Note: Revised versions of papers that were submitted before December 31, 2003, should

be sent by e-mail, not uploaded to the Web site. Such revisions should be sent to the office that handled the original submission:

Editorial Office
Experimental Cell Research
 Karolinska Institute
 CMB, von Eulers vag 3
 17177 Stockholm, Sweden
 Telephone: +46 8-34 04 53
 Fax: +46 8-34 54 29
 E-mail: ecr@cmb.ki.se

Dr. Graham Carpenter
 Associate Editor for North America
Experimental Cell Research
 U.S. Editorial Office
 525 B Street, Suite 1900
 San Diego, CA 92101-4495, USA
 Telephone: (619) 699-6424
 Fax: (619)699-6700
 E-mail: ecr@elsevier.com

or

Authors are encouraged to suggest four competent reviewers in their field (include telephone number, fax number, and/or e-mail address for potential reviewers) and may also suggest individuals whom they wish to have excluded from the review process.

Acceptable file types. Once a paper is accepted, *ECR* cannot use PDF or PostScript files because they do not allow editing of the text. Most word-processing packages are acceptable; however, we prefer that authors use a recent version of Microsoft Word or Corel WordPerfect. Manuscripts saved with formatting intact are preferred. Rich-text format (.rtf extension) is acceptable, but plain text (.txt extension) files are discouraged. Submit each figure as a separate TIFF or EPS file.

Files created in layout programs such as Adobe FrameMaker or PageMaker, QuarkXPress, and Corel Ventura are unacceptable. Artwork should not be embedded within the manuscript. It must be supplied in electronic files separate from the manuscript file.

Terms. Original papers only will be considered. Manuscripts are accepted for review on the understanding that the same work has not been published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the appropriate authority at the institution where the work was carried out. Authors must verify the wording of any cited personal communication with the persons who supplied the information and obtain approval for the use of their names in connection with the quoted information or for the citation of unpublished work; written evidence of such approval should accompany the manuscript. All material published in *ECR* represents the opinions of the authors and should not be construed to reflect the opinions of the Editors or the Publisher.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright, see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided after acceptance.

If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

Manuscripts can be published in the format of **regular articles**. There is no strict size limitation on regular articles, although they usually do not exceed 15,000 words, preceded by an abstract not to exceed 200 words. *ECR* also publishes **review articles**. As with regular articles, there is no strict size limitation, but review articles in the minireview format (3-4 pages written text) receive priority. Most review articles are solicited, but authors interested in contributing review articles or suggesting appropriate topics are encouraged to contact the Editor-in-Chief. Review articles will be subject to review before publication.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be double-spaced throughout. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The *Title Page* (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers).

The *Abstract* (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 200 words. After the abstract a list of up to 10 keywords that will be useful for indexing or searching should be included.

The Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

Acknowledgments should be brief and should precede the references.

References to the literature should be cited by number in square brackets in the text and listed in numerical order at the end. Use the most recent edition of the Chemical Abstracts Service Source Index for abbreviations of journal titles. Please note the following examples:

- [1] K.H. Tan, W. Hunziker, Compartmentalization of fas and fas ligand may prevent auto- or paracrine apoptosis in epithelial cells, *Exp. Cell Res.* 284 (2003) 281-288.
- [2] E.A. Holleran, S. Karki, E.L.F. Holzbaur, The role of the dynactin complex in intracellular motility, in: K.W. Jeon (Ed.), *International Review of Cytology*, Academic Press, San Diego, 1998, Vol. 182, pp. 69-109.

[3] G.N. Stephanopoulos, A.A. Aristidou, J. Nielsen, *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, Academic Press, San Diego, 1998.

Figures. Number figures consecutively with Arabic numerals. Please visit our Web site at <http://authors.elsevier.com/artwork> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

Color figures. One color plate will be published free of charge in each article, provided color is deemed scientifically necessary by the reviewers and the Editorial Board. Additional color figures will be charged to the author. However, if together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, **at no additional charge**, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.

Suggestions for possible **cover photos** are welcomed. Color figures for exclusive use as cover illustrations may be submitted by authors who are also submitting a manuscript for consideration. These figures do not need to relate to the manuscript being submitted but should relate to the larger scope and focus of *ECR*.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

DNA sequences and GenBank accession numbers. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic* copy, the accession number text will be linked

to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal. Files can be stored on 3½-inch diskette, ZIP disk, or CD (either MS-DOS or Macintosh). For more detailed instructions, please contact the Editorial Office (phone: (619) 699-6750; fax: (619) 699-6700; e-mail: ecr@elsevier.com).

Proofs

PDF proofs will be sent to the author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly. Authors will be charged for alterations in excess of 10% of the cost of composition.

Policy

It is understood that **novel biological reagents** described in manuscripts accepted for publication in *ECR*, e.g., DNA and antibodies, will be made available to scientists in academic research. All novel genetic sequence information must be deposited with GenBank or the EMBL database.

Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Elsevier Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions, and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.