

Metabolismo de fosfolípidos hepáticos en *Gallus domesticus*

J. R. Fedriani, Aida Marino, J. M. Macarulla, J. Ugarte y C. Rodríguez

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad del País Vasco
Bilbao (España)

(Recibido el 5 de julio de 1980)

J. R. FEDRIANI, A. MARINO, J. M. MACARULLA, J. UGARTE and C. RODRIGUEZ. *Liver Phospholipid Metabolism in Gallus domesticus*. Rev. esp. Fisiol., 37, 97-102. 1981.

A method is described for the extraction and thin-layer chromatographic separation of phospholipids. Eight separate phospholipid fractions are easily distinguishable.

Liver phospholipid metabolism in *Gallus domesticus* has been studied in newborn chicken (less than 24 h old). (1-¹⁴C) serine, (3-¹⁴C) serine, (2-¹⁴C) ethanolamine and (methyl-¹⁴C) choline were used as radioactive precursors. Serine is incorporated as lysophosphatidylserine, ethanolamine as phosphatidylethanolamine, and choline as L- α -glycerophosphorylcholine. The observed pathways for serine and ethanolamine incorporation and turnover are the same as those described for mammals; the main pathway for choline is the synthesis of phosphatidylcholine from lysophosphatidylcholine.

Debido a la importancia fisiológica de los fosfolípidos, su metabolismo se ha estudiado profusamente en mamíferos (2, 5, 6, 9) y en levaduras (3, 4, 8, 10).

A pesar de estos esfuerzos, los conocimientos actuales sobre el tema están limitados a unas pocas especies, desconociéndose las particularidades metabólicas en otras tales como las aves.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de las vías metabólicas de los fosfolípidos hepáticos en el pollo —*Gallus domesticus*—, y para ello se utilizan precursores marcados con carbono-14.

Material y métodos

Se utilizan pollos machos recién nacidos (menos de 24 horas), a los que se

suministra 62,5 nCi/g de peso corporal de precursor marcado: serina (1-C¹⁴), serina (3-C¹⁴), etanolamina (2-C¹⁴) y colina (metil-C¹⁴) en suero fisiológico, vía intraperitoneal. Hasta el momento de su sacrificio y extracción del hígado se mantienen los pollos a 37° C, disponiendo de agua *ad libitum* y no suministrándose dieta alimenticia alguna.

Los lípidos se extraen con la mezcla de cloroformo/metanol/HCl 12,5 N (200/100/1, v/v) fría y reciente, en la proporción de 2,5 ml/100 mg de tejido. Dicho volumen se distribuye en un 50 %, 33 % y 17 %, realizándose tres adiciones consecutivas al homogenizador Elvehjem-Potter, con émbolo de teflón, donde está depositado el tejido a homogenizar. Una vez reducido a un fino homogenado se

Tabla I. Incorporación y recambio de serina (1-C¹⁴) a las fracciones cromatográficas expresada en c.p.m. netas/ μ g de fósforo lipídico \pm los límites de confianza para $\alpha = 0,001$.

Fracción cromatográfica	Tiempo en horas							
	1	2	4	6	9	12	15	24
NI	0,1 \pm 0,04	0,2 \pm 0,04	0,1 \pm 0,02	2,9 \pm 0,9	1,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,6	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
CR	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	5,7 \pm 1,7	0,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,5	1,4 \pm 0,4	25,9 \pm 7,5
PE	0,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,5	4,8 \pm 1,4	0,8 \pm 0,2	1,8 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2
DPG	0,9 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4	2,6 \pm 0,8	4,2 \pm 1,2	3,4 \pm 1,0	3,7 \pm 1,1
PC	0,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	1,2 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
LPE + SPH	1,4 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4	2,1 \pm 0,6	0,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,4	1,6 \pm 0,5	0,8 \pm 0,2
LPC + PS	4,0 \pm 1,2	17,5 \pm 5,1	4,3 \pm 1,2	4,9 \pm 1,4	1,1 \pm 0,3	0,2 \pm 0,01	0,2 \pm 0,01	1,0 \pm 0,3
GPC + LPS	35,3 \pm 10,2	7,3 \pm 2,1	6,7 \pm 1,9	7,1 \pm 2,1	1,7 \pm 0,5	2,7 \pm 0,8	1,5 \pm 0,5	2,1 \pm 0,6
Total	45,4 \pm 13,1	30,0 \pm 8,7	17,1 \pm 4,9	31,5 \pm 9,1	9,8 \pm 2,9	16,4 \pm 4,7	9,6 \pm 2,8	36,9 \pm 10,7

Tabla II. Incorporación y recambio de serina (3-C¹⁴) a las fracciones cromatográficas expresada en c.p.m. netas/ μ g de fósforo lipídico \pm los límites de confianza para $\alpha = 0,001$.

Fracción cromatográfica	Tiempo en horas							
	1	2	4	6	9	12	15	24
NI	4,0 \pm 1,2	4,9 \pm 1,4	4,5 \pm 1,3	24,6 \pm 7,1	18,3 \pm 5,3	1,5 \pm 0,4	2,9 \pm 0,8	43,8 \pm 12,7
CR	1,0 \pm 0,3	4,6 \pm 1,3	23,2 \pm 6,7	7,7 \pm 2,2	3,4 \pm 1,0	4,8 \pm 1,4	6,4 \pm 1,9	98,8 \pm 28,6
PE	1,2 \pm 0,4	11,8 \pm 3,4	26,8 \pm 7,8	21,4 \pm 6,2	13,6 \pm 3,9	4,3 \pm 1,2	4,9 \pm 1,4	8,4 \pm 2,4
DPG	3,6 \pm 1,0	2,9 \pm 0,8	1,7 \pm 0,5	33,3 \pm 9,6	19,4 \pm 5,6	80,3 \pm 23,2	258,1 \pm 74,7	92,5 \pm 26,8
PC	0,7 \pm 0,2	2,4 \pm 0,7	2,8 \pm 0,8	6,5 \pm 1,9	3,5 \pm 1,0	6,3 \pm 1,8	3,7 \pm 1,1	3,8 \pm 1,1
LPE + SPH	7,8 \pm 2,3	7,1 \pm 2,0	6,5 \pm 1,9	16,9 \pm 4,9	3,5 \pm 1,0	11,5 \pm 3,3	29,0 \pm 8,4	24,2 \pm 7,0
LPC + PS	8,6 \pm 2,5	20,7 \pm 6,0	6,7 \pm 1,9	48,6 \pm 14,1	2,6 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4	0,9 \pm 0,3	2,1 \pm 0,6
GPC + LPS	55,7 \pm 16,1	13,9 \pm 4,0	8,1 \pm 2,3	17,8 \pm 5,1	2,1 \pm 0,6	5,1 \pm 1,5	2,3 \pm 0,7	3,4 \pm 1,0
Total	86,9 \pm 25,2	71,8 \pm 20,8	84,4 \pm 24,4	186,1 \pm 53,8	70,0 \pm 20,2	121,2 \pm 35,1	324,4 \pm 93,9	291,7 \pm 84,4

Tabla III. Incorporación y recambio de etanolamina (2-C*) a las fracciones cromatográficas expresada en c.p.m. netas/ μ g de fóforo lípidico \pm los límites de confianza para $\alpha = 0,001$.

Fracción cromatográfica	Tiempo en horas									
	1	2	4	6	9	12	15	24		
NI	25,9 \pm 7,5	46,9 \pm 13,6	13,4 \pm 3,9	39,6 \pm 11,5	213,3 \pm 61,7	12,2 \pm 3,5	15,3 \pm 4,4	48,3 \pm 14,0		
CR	23,5 \pm 6,8	65,9 \pm 19,1	52,6 \pm 15,2	146,3 \pm 42,3	26,3 \pm 7,6	15,2 \pm 4,4	4,9 \pm 1,4	160,4 \pm 46,4		
PE	5.968,6 \pm 1.726,6	1.702,1 \pm 492,4	2.188,3 \pm 633,0	5.638,8 \pm 1.631,2	1.968,1 \pm 569,3	359,8 \pm 104,1	146,8 \pm 42,5	236,9 \pm 68,6		
DPG	20,6 \pm 5,9	18,6 \pm 5,4	29,3 \pm 8,5	12,2 \pm 3,5	18,6 \pm 5,4	30,2 \pm 8,7	29,5 \pm 8,5	8,1 \pm 2,3		
PC	24,1 \pm 7,0	71,0 \pm 20,5	71,3 \pm 20,6	63,6 \pm 18,4	186,2 \pm 53,9	36,9 \pm 10,6	17,4 \pm 5,0	28,7 \pm 8,3		
LPE + SPH	342,9 \pm 99,2	195,9 \pm 56,7	156,1 \pm 45,1	392,7 \pm 113,6	113,4 \pm 32,8	104,6 \pm 30,3	191,0 \pm 55,3	59,5 \pm 17,2		
LPC + PS	14,7 \pm 4,3	438,4 \pm 126,8	155,9 \pm 45,2	64,5 \pm 18,7	17,8 \pm 5,2	16,3 \pm 4,7	40,6 \pm 11,7	13,0 \pm 3,8		
GPC + LPS	307,9 \pm 89,1	214,6 \pm 62,1	115,9 \pm 33,5	99,4 \pm 28,7	22,6 \pm 6,6	131,4 \pm 38,0	233,0 \pm 67,4	20,1 \pm 5,8		
Total	7.082,0 \pm 2.048,7	2.898,1 \pm 838,4	2.929,1 \pm 847,4	6.796,7 \pm 1.966,2	2.701,2 \pm 781,4	743,3 \pm 215,0	714,2 \pm 206,6	605,4 \pm 175,1		

Tabla IV. Incorporación y recambio de colina (metil-C*) a las fracciones cromatográficas expresada en c.p.m. netas/ μ g de fóforo lípidico \pm los límites de confianza para $\alpha = 0,001$.

Fracción cromatográfica	Tiempo en horas									
	1	2	4	6	9	12	15	24		
NI	1,1 \pm 0,3	3,2 \pm 0,9	0,7 \pm 0,2	7,1 \pm 2,0	0,9 \pm 0,3	8,1 \pm 2,4	5,1 \pm 1,5	9,9 \pm 2,9		
CR	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	3,6 \pm 1,1	9,7 \pm 2,8	1,6 \pm 0,5	3,4 \pm 1,0	1,6 \pm 0,5	17,2 \pm 5,0		
PE	3,0 \pm 0,9	0,7 \pm 0,2	2,1 \pm 0,6	9,9 \pm 2,9	3,6 \pm 1,0	2,0 \pm 0,6	1,5 \pm 0,4	1,6 \pm 0,5		
DPG	0,8 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,4	3,3 \pm 1,0	4,7 \pm 1,4	25,8 \pm 7,5	3,8 \pm 1,1		
PC	47,5 \pm 13,7	53,6 \pm 15,5	71,5 \pm 20,7	77,2 \pm 22,3	112,5 \pm 32,5	45,9 \pm 13,2	48,5 \pm 14,0	23,4 \pm 6,8		
LPE + SPH	5,3 \pm 1,5	4,8 \pm 1,4	2,1 \pm 0,6	26,5 \pm 7,7	12,6 \pm 3,6	3,9 \pm 1,1	18,1 \pm 5,2	5,8 \pm 1,7		
LPC + PS	25,1 \pm 7,3	293,5 \pm 84,9	12,2 \pm 3,5	20,6 \pm 6,0	9,0 \pm 2,6	4,3 \pm 1,2	10,1 \pm 2,9	7,5 \pm 2,2		
GPC + LPS	157,0 \pm 45,4	23,4 \pm 6,8	14,5 \pm 4,2	19,1 \pm 5,5	6,7 \pm 1,9	7,1 \pm 2,7	10,0 \pm 2,9	5,9 \pm 1,7		
Total	253,1 \pm 73,2	401,1 \pm 116,0	112,6 \pm 32,6	180,3 \pm 52,2	158,0 \pm 45,7	83,3 \pm 24,1	127,0 \pm 36,7	79,1 \pm 22,9		

añade HCl 0,1 N en la proporción de 1,7 ml/100 mg de tejido fresco y se homogeniza nuevamente. Se centrifuga a $5.000 \times g$ durante 20 minutos y se separa y concentra la fase inferior.

El fraccionamiento de los fosfolípidos en capa fina se realiza en placas de silicagel H Merck de 400 micras de espesor en húmedo, con el sistema de eluyentes de NESKOVIC y KOSTIC (7), llevando el segundo eluyente a pH 5,5 con KOH sólido. Los recorridos exactos son 170 mm para el primer eluyente y 180 mm para el segundo; entre ambos la placa debe ser aireada hasta la total eliminación del amoniaco.

Las fracciones obtenidas se identifican mediante comparación de R_f con patrones puros, reacciones específicas de grupos funcionales y mediante la incorporación de precursores marcados con C^{14} .

El recuento de la radiactividad incorporada se realiza en un contador de centelleo líquido Intertechnique modelo ABAC SL-40, utilizando como centelleador líquido la mezcla dioxano/naftaleno/PPO/POPOP (1.000 ml/100 g/7 g/0,3 g) diluida con agua en la proporción 5:1 (v/v).

El fósforo lipídico se determina según FISKE y SUBBAROW (1).

Los resultados obtenidos se someten a un riguroso tratamiento estadístico, y se expresan en forma de la media \pm los límites de confianza para $\alpha = 0,001$.

Resultados

En la cromatografía de fosfolípidos se obtienen ocho fracciones, cuyos valores de $R_f \times 100$ referidos al frente del segundo eluyente y su identificación es la siguiente: 1.^a, L- α -glicerofosforilcolina (GPC) y lisofosfatidilserina (LPS) $3,97 \pm 0,42$; 2.^a, lisofosfatidilcolina (LPC) y fosfatidilserina (PS) $10,47 \pm 0,84$; 3.^a lisofosfatidiletanolamina (LPE) y ceramido-fosforilcolina (SPH) $16,12 \pm 0,89$; 4.^a, fosfatidilcolina (PC) $26,31 \pm 1,19$; 5.^a, car-

diolipina (DPG) $37,06 \pm 1,33$; 6.^a, fosfatidiletanolamina (PE) $45,42 \pm 1,55$; 7.^a, cerebrósidos (CR) $57,38 \pm 1,67$; 8.^a, no identificada $75,70 \pm 1,97$; por encima de la octava fracción y con el frente del segundo eluyente se separan los lípidos neutros.

Los resultados de la incorporación y recambio de los cuatro precursores marcados con C^{14} se resumen en las tablas I a IV.

Discusión

Se observa una desigual incorporación de los precursores, presentando la máxima incorporación la etanolamina (2- C^{14}), seguida de la colina (metil- C^{14}), serina (3- C^{14}) y serina (1- C^{14}). La baja incorporación de serina se debe a su incorporación mayoritaria al metabolismo de aminoácidos y proteínas; por otra parte, una vez descarboxilada la serina (1- C^{14}), el marcaje se pierde, no así en la serina (3- C^{14}), que por descarboxilación se transforma en etanolamina (1- C^{14}) y se conserva hasta la biosíntesis de colina.

Los valores expresados en las tablas I a IV indican claramente la ruta de incorporación y recambio seguida por los precursores. La serina (1- C^{14}) se incorpora mayoritariamente en forma de lisofosfatidilserina (1.^a hora), transformándose a las 2 horas en fosfatidilserina. La serina (3- C^{14}) se incorpora de forma análoga a la serina (1- C^{14}) y entre las 4-6 horas. Por descarboxilación, la fosfatidilserina se transforma en fosfatidiletanolamina cuyo máximo aparece a las 4 horas. La incorporación de etanolamina (2- C^{14}) tiene lugar como fosfatidiletanolamina (1.^a hora) y por metilaciones sucesivas se recambia a fosfatidilcolina (máximo a las 9 horas). La biosíntesis de esfingomielinas comienza hacia las 4 horas y presenta el máximo a las 15 horas.

Se detecta radiactividad acusada en las manchas 5.^a y 7.^a que contienen, aparte del compuesto mayoritario señalado,

fosfatidil-N-metiletanolamina y fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina, respectivamente (A. MARINO, Tesis doctoral, pendiente de terminación).

Los datos de la incorporación de colina muestran que la célula hepática de pollo no sintetiza directamente la fosfatidilcolina al suministrar la base libre. Dicha síntesis se efectúa de modo indirecto a través de la L- α -glicerofosforilcolina (1.^a hora), que por acilación da lisofosfatidilcolina (2.^a hora) y lentamente se transforma en fosfatidilcolina (máxima actividad específica a las 9 horas).

De todo lo anterior se deduce que la génesis de fosfolípidos en el pollo es cualitativamente análoga a la de los mamíferos, con las particularidades notables de: a) incorporación preferente de etanolamina sobre las demás bases; b) la metilación subsiguiente a fosfatidilcolina pasando fugazmente por los dos intermediarios parcialmente metilados; c) incorporación menor de colina que se inicia por L- α -glicerofosforilcolina, sigue la acilación a lisoderivados y finalmente a fosfatidilcolina; y d) las muy exiguas incorporaciones de serina que tiene un metabolismo preferentemente proteico, que incluso puede originar glicerol-P.

Resumen

Se describe un método de extracción y fraccionamiento de fosfolípidos en capa fina, con el cual se obtienen ocho fracciones perfectamente diferenciadas.

El metabolismo de los fosfolípidos hepáticos en *Gallus domesticus* se estudia en pollos recién nacidos (menos de 24 horas). Se utiliza serina (1-C¹⁴), serina (3-C¹⁴), etanolamina (2-C¹⁴) y colina (metil-C¹⁴) como precursores radiactivos. Los resultados muestran la incorporación de serina en forma de lisofosfatidilserina, de etanolamina en forma de fosfatidiletanolamina y de colina como L- α -glicerofosforilcolina. Las vías de incorporación y recambio de serina y de etanolamina coinciden con las descritas en mamíferos; respecto a la colina se evidencia la síntesis predominante de fosfatidilcolina a partir de lisofosfatidilcolina.

Bibliografía

1. FISKE, C. H. y SUBBAROW, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400, 1925.
2. HALLMAN, M. y KANHARE, P.: *Lipids*, 14, 435-440, 1979.
3. KANEKO, H., HOSOHARA, M., TANAKA, M. y ITOH, T.: *Lipids*, 11, 837-844, 1976.
4. KUSHWAHA, S. C. y KATES, M.: *Lipids*, 11, 778-780, 1976.
5. LYMAN, R. L., GIOTAS, C., MEDWADOWSKI, B. y MILJANICH, P.: *Lipids*, 10, 157-167, 1975.
6. MANSBACH, C. M.: *Lipids*, 10, 318-321, 1975.
7. NESKOVIC, N. M. y KOSTIC, D. M.: *J. Chromatog.*, 35, 297-300, 1968.
8. RAJU, K. S., MAMESWARI, R. y SASTRY, D. S.: *Lipids*, 11, 741-746, 1976.
9. TREWHELLA, M. A. y COLLINS, F. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 296, 51-61, 1973.
10. WASSEF, M. K. y AMMON, V.: *Lipids*, 10, 185-190, 1975.

