





*UNIVERSIDAD DE ALCALÁ*  
*DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS*



***EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS  
SOBRE LA HOMEOSTASIS  
INTRACELULAR DEL COLESTEROL***

*Tesis doctoral*

*Alberto Canfrán Duque*

*Dirigida por: Dr. Miguel Ángel Lasunción Ripa y*

*Dra. Rebeca Busto Durán*



Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida del proyecto, SAF2008-01104 y SAF2011-29951 del Ministerio de Economía y Competitividad y del CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (una iniciativa del ISCIII); a una beca FPI (BES-2009-014938) concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad; y las infraestructuras del Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS).



*Dedicada a mi familia que son un ejemplo de esfuerzo, dedicación y brillantez, pura ciencia. Y a Rocío la científico que mas quiero, respeto y admiro.*

*Dedicada especialmente a mi madre por ser tan fuerte y valiente, bajo cualquier circunstancia. Eres el barco que nos lleva a salvo a la otra orilla*





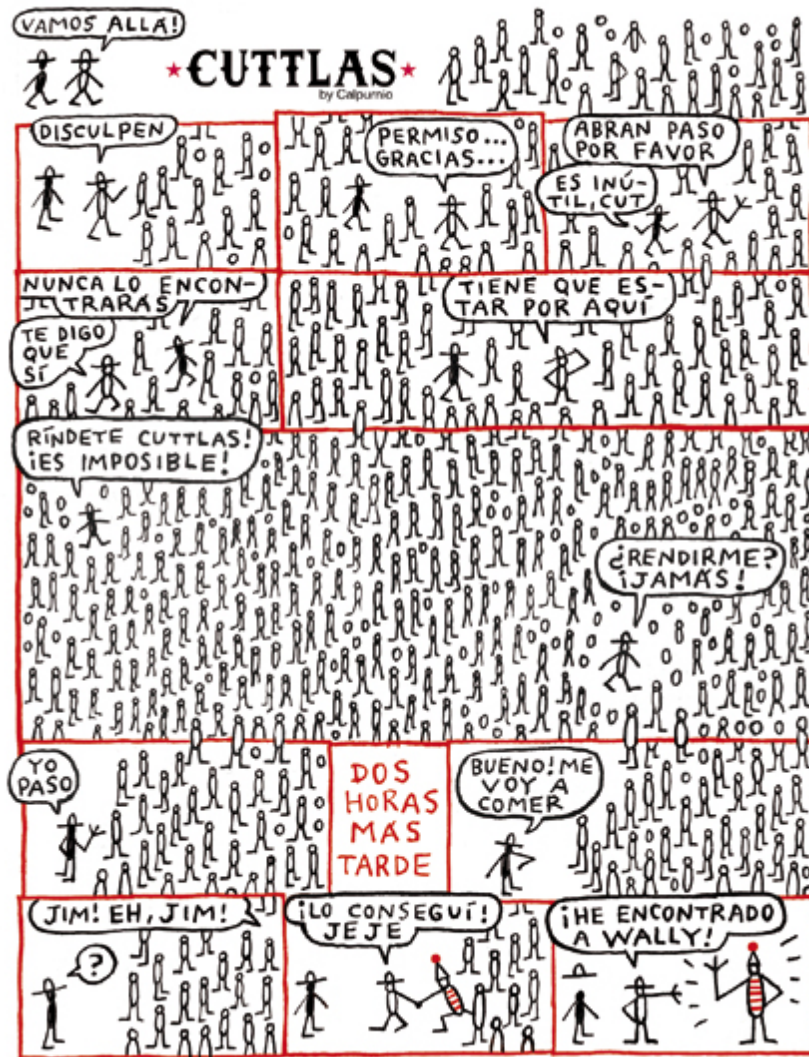


Imagen tomada de [www.e2cengineering.blogspot.com](http://www.e2cengineering.blogspot.com)

*La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces*  
 (Aristóteles (384 AC-322 AC) Filósofo griego)

*Elige un trabajo que te guste y no tendrás que trabajar ni un día de tu vida*  
 (Confucio (551 AC-478 AC) Filósofo chino)



Quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento:

A mis directores de tesis el Dr. Miguel Ángel Lasunción y la Dra. Rebeca Busto por sembrar en mí, valores que me hacen un buen científico y una mejor persona. Gracias porque no sólo habéis sido mis jefes, si no que sobre todo habéis sido mis amigos. Gracias por acompañarme y guiarme en cada momento durante los últimos cuatro años. Gracias por confiar en mí desde el primer día y darme la oportunidad de formar parte de vuestro laboratorio. Gracias por escucharme y tratarme de igual a igual. Gracias por dar alas a mi carrera científica. Hace algo más de cuatro años, Miguel Ángel, me preguntaste: "¿Qué quieres ser de mayor?". Hoy puedo contestarte que quiero ser tan buena persona y buen científico como vosotros dos.

Gracias a la Dra. Antonia Martín-Hidalgo, al Dr. Diego Gómez-Coronado y al Dr. Javier Martínez-Botas, por la ayuda que me han prestado siempre que lo he necesitado, y por el tiempo tan ameno que hemos compartido en estos cuatro años. Gracias por inculcarme el compañerismo y el esfuerzo en el trabajo, dos valores indispensables en esta profesión.

Gracias al Dr. Oscar Pastor Rojo, por su apoyo científico y técnico en esta tesis. He aprendido mucho de tí, y sabes que parte de este trabajo es tan tuyo como mío. Pero sobre todo gracias por tu buena predisposición conmigo y por tu amistad. También quería agradecer todo lo que han hecho por mí las personas que han pasado por tu laboratorio los últimos cuatro años, con especial cariño a Carmen que me enseñó que cualquier día en el trabajo es un buen día para sonreír y disfrutar.

Un agradecimiento especial te mereces Mila, espero que al ver este trabajo te sientas orgullosa de las horas que has pasado ayudándome con las inmunocitoquímicas y demás tareas del laboratorio. Gracias por tu siempre eficaz ayuda y gracias por tu amistad.

Paquí ¿has guardado? Gracias por ser como eres y darme todo lo que tienes, gracias por enseñarme lo que es la capacidad de superación, eres un espejo donde siempre quiero mirarme.

Gema ¿bikini? Muchas gracias por todo lo que me has ayudado en estos cuatro años, y sabes que no sólo me refiero a lo científico. Eres las ganas de trabajar en persona y te admiro muchísimo.

Gracias a la Dra. María Emilia Casado, a la Dr. Covadonga Martín, a Lorena, a Vero, a Irene y a Paloma, en primer lugar por su sincera amistad, con todo lo que ello implica, y en su segundo lugar por ayudarme en todo lo que ha estado en vuestra mano. Y sobre todo por hacerme el día a día mas sencillo y divertido, y por cuidar de mí tanto. Habéis sido un gran apoyo para mí.

A la Dra. Lidia Daimiel y a María Eugenia por darme vuestra ayuda y vuestros consejos sin dudarlo. Gracias por las risas y las charlas sobre ciencia que hemos compartido.

Akelarre!!! Gracias a Ana, Geli y Lydia por todo lo que habéis hecho por mí y junto con Maica, Merche y Maribel, gracias por el cariño y afecto que me habéis dado. Gracias por los buenos ratos que me habéis hecho pasar. También mi agradecimiento por los buenos ratos a las "chicas del carrito de los helados", Ascen, Feli y Nines.

Gracias a todos los compañeros del Ramón y Cajal. Gracias a Rafa por su apoyo con el microscopio confocal y junto con el Dr. Juan Perucho gracias por aportarme hormonas masculinas. Gracias a Ana por darme todo lo que te he pedido, incluso tu amistad y sobre todo gracias por escucharme en el tren a costa de tu siesta. Gracias a Dra. María José Casarejos, a Mari Paz, Amparo y a Silvia por brindarme siempre una sonrisa y por ayudarme en todo lo que os he pedido. Gracias a Lucía y a Lara por mostrarme vuestro interés. Al Dr. Carlos Páino me gustaría agradecerle sus consejos. Gracias al Dr. Luis Barrio que entre experimento y experimento metimos alguna canasta y a su fantástico equipo. Gracias a todo el grupo de proteínas a Celia la nueva gaditana, a Eva, a Marta y al Dr. Jerónimo Fernández por tener siempre un "buenos días" y una sonrisa para mí, gracias al Dr. Víctor González y la Dra. Elena Martín por hacer más amena mi estancia en el despacho. También mi agradecimiento por todo al Dr. Alberto Alcazar a la Dra. Irene Ayuso y a Emma. Mi agradecimiento especial al Dr. Luis Orensanz y a la Dra. María Ángeles Mena.

Gracias al Dr. Carlos Fernández-Hernando y a la Dra. Yajaira Suárez por permitirme hacer una estancia de seis meses en su laboratorio en la Universidad de Nueva York Langone Medical Center. Con especial cariño quiero dar mi agradecimiento al Dr. Juan Francisco Aranda, la Dra. Noemí Rotllan, la Dra. Cristina Ramírez, la Dra. Aránzazu Chamorro y el Dr. Julio Madrigal, por darme vuestra amistad, cuidarme y enseñarme, durante esos seis meses en Nueva York. I also want to thank Elisa, Leigh, Jeff and Binod for giving me your friendship and teach me in the lab.

Por último quería dar las gracias a toda mi familia y en especial a Rocío y su familia, por prestarme todos ellos su apoyo y su cariño. Hoy soy lo que soy gracias a vosotros. Todos me habéis inspirado y me habéis enseñado cosas que me han convertido en lo que hoy soy. Gracias por vuestro apoyo incondicional. Todas las palabras que hay en esta tesis se quedan cortas para agradeceros todo lo que hacéis por mí cada día.

Muchas GRACIAS a todos/as y espero poder devolveros algún día el 10% de lo que me habéis dado

# ÍNDICE

<i>Abreviaturas</i> .....	1
Summary/Resumen.....	5
<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
1. HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL.....	13
1.1. Biosíntesis del colesterol .....	13
1.2. Captación del colesterol de las lipoproteínas .....	18
1.3. Salida del colesterol celular.....	22
2. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL .....	24
2.1. Regulación mediada por el complejo srebp-scrap-insig.....	24
2.2. Regulación mediada por receptores nucleares.....	27
2.3. Regulación post-transcripcional .....	28
2.4. Regulación mediada por microARN .....	29
3. PAPEL DEL COLESTEROL EN LA HOMEOSTASIS DE OTROS METABOLISMOS.....	30
3.1. Metabolismo de los ácidos grasos .....	30
4. ANTIPSICÓTICOS.....	31
4.1. Acción terapéutica de los antipsicóticos.....	31
4.2. Efectos metabólicos de los antipsicóticos .....	34
4.3. Efectos in vitro de los antipsicóticos .....	36
5. EXOSOMAS .....	38
5.1. Biogénesis de los exosomas .....	38
5.2. Secreción de los exosomas .....	39
5.3. Función de los exosomas.....	39
<b>Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>45</b>
1. ANTIPSICÓTICOS.....	47
2. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES .....	47
2.1. Células HepG2.....	47
2.2. Células SH-SY5Y .....	47
2.3. Células HL-60 .....	48
2.4. Células THP-1 .....	48

3. OBTENCIÓN DE LIPOPROTEÍNAS (LDL Y DiI-LDL) Y SUERO DEFICIENTE EN LIPOPROTEÍNAS.....	48
4. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ESTEROLES .....	49
5. ANÁLISIS DE ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM).....	50
6. SÍNTESIS DE LÍPIDOS .....	50
7. SALIDA DE COLESTEROL AL MEDIO EXTRACELULAR .....	51
8. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE DII-LDL POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	52
9. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS .....	52
10. DETECCIÓN DE APOB EN EL MEDIO EXTRACELULAR Y EN LISADOS CELULARES .....	52
11. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE EXOSOMAS .....	54
11.1. Análisis de la actividad de la $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa.....	54
11.2. Análisis de exosomas mediante citometría de flujo .....	55
11.3. Análisis de exosomas por microscopía electrónica.....	55
12. INMUNODETECCIÓN POR WESTERN-BLOT.....	56
13. INMUNOCITOQUÍMICA.....	57
13.1. Inmunocitoquímica y microscopía confocal.....	57
13.2. Tinción de esfingomielina .....	57
13.3. Tinción con DQ-BSA .....	58
14. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL .....	58
14.1. Extracción de ARN.....	58
14.2. Retrotranscripción (RT).....	59
14.3. PCR en tiempo real.....	59
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	61
<b>Resultados .....</b>	<b>63</b>
1. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL.....	65
1.1. Estudio del efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis de colesterol en células HepG2.....	65

1.2. Estudio del efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis de colesterol en células HL-60 .....	66
1.3. Análisis de la composición de esteroides en células HepG2 por CG/EM....	69
1.4. Análisis de la composición de esteroides en otros tipos celulares por CG/EM .....	70
2. CAMBIOS EN LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL TRAS RETIRAR LOS ANTIPSICÓTICOS DEL MEDIO DE CULTIVO (PERIODO DE LAVADO).....	75
3. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE EL TRÁFICO INTRACELULAR DE COLESTEROL DE LAS LDL .....	76
4. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA .	86
5. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA INCORPORACIÓN DE [ <sup>14</sup> C]-ACETATO A LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y LÍPIDOS SAPONIFICABLES.....	90
6. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SECRECIÓN DE APOB .....	92
7. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL TRÁFICO DEL COLESTEROL DE LAS LDL PRODUCIDA POR LOS ANTIPSICÓTICOS.....	95
8. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA SECRECIÓN DE COLESTEROL.....	98
9. LA CURCUMINA PROMUEVE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS .....	98
10. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS .....	104

**Discusión .....** **107**

1. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA COLESTEROGÉNESIS .....	109
2. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE EL TRÁFICO INTRACELULAR .....	115
3. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA	118
4. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS SAPONIFICABLES.....	120
5. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SECRECIÓN DE APOB .....	121

6. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA ACUMULACIÓN  
INTRACELULAR DE LÍPIDOS PROVOCADA POR LOS ANTIPSICÓTICOS 122

**Conclusiones** .....127

**Bibliografía** .....131

**Publicaciones**.....149



*Abreviaturas*

---



## ABREVIARURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
ABCG5/8	<i>ATP-binding cassette transporter G5/G8</i>
ACAT	<i>Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ACL	<i>ATP-citrate lyase</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
apoA	Apolipoproteína A
apoB	Apolipoproteína B
apoE	Apolipoproteína E
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
7DHC	7-deshidrocolesterol
8DHC	8-deshidrocolesterol
7DHD	7-deshidrodeshmosterol
DHCR24	Esterol $\Delta^{24}$ -reductasa ( <i>24-dehydrocholesterol reductase</i> )
DHL	Dihidrolanosterol
DiI	1,1'-dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-in-docarbocianinaperclorato
DiI-LDL	LDL marcadas con DiI
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfoxido
EE	Endosoma temprano (early endosome)
EEA	<i>Early endosome antigen</i>
FBS	Suero fetal bovino ( <i>Foetal Bovine Serum</i> )
FF-MAS	<i>Follicular fluid meiosis activating sterol</i>
FGA	Antipsicótico de primera generación ( <i>First generation antipsychotic</i> )
FPP	Farnesil difosfato
GPP	Geranil difosfato
$\beta$ -hexosaminidasa	$\beta$ -N-acetilglucosaminidasa

## Abreviaturas

---

HDL	Lipoproteína de alta densidad ( <i>high density lipoprotein</i> )
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IDOL	<i>Inducible degrader of the LDL receptor</i>
INSIG	<i>Insulin-induced gene</i>
IPP	Insopentenil pirofosfato
LAMP2	<i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>
LBPA	Ácido lisobifosfatídico
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad ( <i>low density lipoprotein</i> )
LDLR	Receptor de LDL ( <i>LDL receptor</i> )
LPDS	Suero deficiente en lipoproteínas
LPL	Lipoproteína lipasa
LXR	Receptor X del hígado ( <i>liver X receptor</i> )
miARN	micro ARN
miR-33	micro ARN 33
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MVB	Cuerpo multivesiculares ( <i>multivesicular body</i> )
NGS	Suero normal de cabra ( <i>normal serum goat</i> )
NPC	Niemman-Pick tipo C
NPC1	Niemman-Pick tipo C1
NPC2	Niemman-Pick tipo C2
PCSK9	<i>Protein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PFA	Paraformaldehído
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RPMI	RPMI 1640
RPLP0	Proteína ácida de la subunidad 60S del ribosoma
RT	Retrotranscripción
S1P	<i>Site-1 protease</i>
S2P	<i>Site-2 protease</i>
SCAP	<i>SREB- clavage activating protein</i>

## Abreviaturas

---

SCD	Estearoil-CoA desaturasa ( <i>Stearoyl-CoA desaturase</i> )
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SGA	Antipsicótico de segunda generación ( <i>second generation antipsychotic</i> )
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo I ( <i>scavenger receptor class B type I</i> )
SRE	Elemento de respuesta a esteroides ( <i>sterol respond element</i> )
SREBP	Proteína de unión a dominio sensible a esteroides ( <i>Sterol respond element binding protein</i> )
SSD	Dominio sensible a esteroides ( <i>sterol sensitive domain</i> )
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
T-MAS	<i>testicle meiosis activating sterol</i>
TRC	Transporte reverso de colesterol
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>very low density lipoprotein</i> )



*Summary/Resumen*

---





## SUMMARY

Antipsychotics are cationic amphiphilic drugs that are commonly used in the treatment of some psychiatric disorders, due to their ability to bind to D2 receptors. Unfortunately, some of the most common antipsychotics, especially the second generation antipsychotics (SGAs), produce metabolic side effects such as hypertriglyceridemia, hyperglycemia and increased cardiovascular risk. To explore the potential mechanisms that underlie these side effects, in the present work, we studied certain aspects of intracellular lipid homeostasis and secretion in various cell lines (HepG2, HL-60 and SH-SY5Y).

Risperidone and ziprasidone, two of the SGAs studied, and haloperidol, a first generation antipsychotic, were shown to inhibit cholesterol biosynthesis and affect the enzymatic activity of  $\Delta^7$ -reductase >  $\Delta^{8,7}$ -isomerase =  $\Delta^5$ -desaturase >  $\Delta^{14}$ -reductase, with different relative activities: ziprasidone > haloperidol > risperidone. In contrast, clozapine, another SGA, decreased  $\Delta^{24}$ -reductase activity, and to a minor extent, it also affected  $\Delta^{8,7}$ -isomerase. The effect of the antipsychotics on cholesterol biosynthesis resulted in a decrease in cholesterol cell content and an increase in intermediate sterols. We also showed an increase in the expression of *SREBF2* and its target genes, *HMGCR* and *LDLR*, a homeostatic response that it is activated when the cholesterol amount decreases in the endoplasmic reticulum (ER). Shortly after the removal of antipsychotics, the  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into cholesterol was recovered, even though it was higher than in the control condition. This effect is attributed to the overexpression of cholesterologenesis enzymes and the relief of the antipsychotic-induced enzyme inhibition.

Moreover, in HepG2 cells we observed an increase in the expression of *SREBF1* and one of its targets, *FASN*. This increase is associated with an increase in fatty acids and complex lipid (phospholipids and triglycerides) synthesis, as well as apoB synthesis and secretion. The highest effect in apoB was during the washout period. These results can explain why patients who take antipsychotics often have hypertriglyceridemia.

On the other hand, all tested antipsychotics affected the LDL endocytic pathway, triggering free cholesterol accumulation in the endo-lysosomes because of the inhibition of the egress into the ER. The drugs did not seem to affect earlier steps in the endocytic pathway or lysosome hydrolytic enzyme activities. These effects, plus the stimulation of

the LDL receptor, promote the intracellular accumulation of some lipids and perinuclear vesicle profusion in cells treated with antipsychotics.

The cellular phenotype is similar, but not identical, to that observed in NPC1 deficient cells or in cells treated with other cationic amphiphilic drugs, like U18666A. Thus, we studied whether it was possible to correct this phenotype using curcumin, a polyphenol which increases cytosolic calcium. When we exposed antipsychotic-treated cells to curcumin, the intracellular vesicles moved to the cell periphery and the exosome release increased. This phenomenon resulted in the release of free cholesterol to the extracellular media and the normalization of the expression of lipid metabolism-related genes. The improvement in the cell phenotype induced by curcumin offers the possibility to relieve the antipsychotic metabolic side effects with dietary polyphenols.

## RESUMEN

Los antipsicóticos son aminos anfipáticas que se utilizan ampliamente para el tratamiento de ciertos trastornos psiquiátricos por su capacidad de inhibir los receptores D2. Desafortunadamente, algunos de los más utilizados, particularmente los de segunda generación (SGA), producen efectos metabólicos indeseados como ganancia de peso, hipertrigliceridemia e hiperglucemia, con incremento del riesgo cardiovascular. Para explorar los mecanismos potencialmente implicados en estos efectos secundarios, en el presente trabajo hemos estudiado ciertos aspectos de la homeostasis intracelular de lípidos y de su secreción en diversas líneas celulares (HepG2, HL-60 y SH-SY5Y). La risperidona y la ziprasidona, dos antipsicóticos de SGA, y el haloperidol, de primera generación, hemos observado que inhiben la biosíntesis de colesterol, afectando la actividad de las siguientes enzimas de la ruta:  $\Delta^7$ -reductasa >  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa =  $\Delta^5$ -desaturasa >  $\Delta^{14}$ -reductasa, siendo su potencia relativa: ziprasidona > haloperidol > risperidona. Por otro lado, la clozapina, otro antipsicótico de SGA, redujo la actividad  $\Delta^{24}$ -reductasa, y, en menor medida, también la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa. Estas acciones condujeron al descenso del contenido celular de colesterol, así como al incremento de los esteroides intermediarios, sustratos de dichas enzimas. Observamos también un incremento de la expresión de *SREBF2* y de sus genes diana *HMGR* y *LDLR*, una respuesta homeostática que se dispara cuando se detecta un descenso del contenido de colesterol en el retículo endoplasmático (RE). Poco después de retirar los antipsicóticos del medio, la tasa de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato a colesterol se recupera llegando incluso a superar la observada en la situación control, lo cual se atribuye a la sobreexpresión de las enzimas de la colesterogénesis junto a la desaparición de la inhibición directa de las enzimas por acción de los antipsicóticos. En las células HepG2, además se observa un incremento en la expresión de *SREBF1* y de su gen diana *FASN* que se asocia con un aumento de la síntesis de ácidos grasos y lípidos saponificables (fosfolípidos y triglicéridos), así como de la síntesis y secreción de apoB que se detecta principalmente en el periodo de lavado de los antipsicóticos. Este efecto puede explicar la hipertrigliceridemia que con frecuencia se presenta en los pacientes tratados con estos fármacos. Por otra parte, todos los antipsicóticos utilizados afectan la vía endocítica de utilización de las LDL, provocando la acumulación de colesterol libre en los endolisosomas, probablemente por inhibición de su salida hacia el RE, sin afectar etapas anteriores de esta vía ni la actividad de enzimas hidrolíticas lisosomales. Este efecto,

junto con la estimulación del receptor de LDL, contribuye al depósito intracelular de ciertos lípidos y a la profusión de vesículas perinucleares que se detectan en las células expuestas a los antipsicóticos. Este fenotipo celular es similar, aunque no idéntico al que se detecta en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C y al producido por otras aminas anfipáticas, como el U18666A. Para explorar si este fenotipo puede corregirse, utilizamos curcumina, un polifenol que incrementa el calcio citoplasmático. En las células previamente tratadas con los antipsicóticos, observamos que la exposición a la curcumina desplazaba las vesículas intracelulares hacia la periferia y estimulaba la secreción de exosomas, descargando el colesterol acumulado al exterior y normalizando la expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico. Esta mejoría en el fenotipo celular abre la posibilidad de aliviar los efectos metabólicos de los antipsicóticos con polifenoles presentes en los alimentos.

## *Introducción*

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL

El colesterol es una molécula esencial para la biología de las células de los mamíferos. Por un lado, es un componente fundamental de las membranas celulares, donde coopera con otras moléculas para establecer las características de permeabilidad y fluidez únicas de esas estructuras. Pero en las membranas el colesterol no se limita a desempeñar ese papel, sino que también es capaz de modular la actividad de las proteínas allí presentes, mediante la interacción directa o por la agrupación de las mismas en los microdominios de membrana denominados balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Maxfield and Tabas, 2005). Por otro lado, el colesterol juega un importante papel en el metabolismo, ya que es el precursor de moléculas como las hormonas esteroideas, los ácidos biliares y los oxisteroles bioactivos (Chang et al., 2006; van der Velde, 2010). Además, este esteroide es fundamental para el patrón de desarrollo y diferenciación celular durante la embriogénesis debido a la formación de aductos con las proteínas de la familia Hedgehog (Farese and Herz, 1998; Ingham, 2001). Por otra parte, el colesterol es necesario para la diferenciación neuronal y el desarrollo de las sinapsis (Mauch et al., 2001; Pfrieger, 2003). Finalmente, cabe destacar el requerimiento de colesterol para la división celular (Brown and Goldstein, 1974; Chen et al., 1974; Martínez-Botas et al., 1999; Martínez-Botas et al., 2001; Fernández et al., 2004) y su acción reguladora de la progresión del ciclo celular (Martínez-Botas et al., 1999; Fernández et al., 2004).

Debido a la importancia del colesterol a nivel estructural, metabólico y regulador, las células mantienen la homeostasis del colesterol por dos vías alternativas: la biosíntesis de colesterol a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) y la captación del colesterol de las lipoproteínas plasmáticas, fundamentalmente mediante endocitosis de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de su receptor específico (LDLR) (Brown and Goldstein, 1983).

#### 1.1. Biosíntesis del colesterol

La colesterogénesis es una ruta multienzimática que discurre entre el citoplasma, el retículo endoplasmático (RE) y los peroxisomas (Kovacs et al., 2004). A lo largo de esta ruta se sintetizan diversos metabolitos, tanto de carácter esteroídico como no

esteroídico, algunos de los cuales son fundamentales para la célula (Goldstein and Brown, 1990).

El proceso comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA dando lugar a acetoacetil-CoA, que se une a una nueva molécula de acetil-CoA generando HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) por acción de la enzima HMG-CoA sintasa (**Figura 1A**). Este compuesto es reducido a mevalonato por la enzima HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la ruta que se encuentra regulada a múltiples niveles. Después de dos fosforilaciones consecutivas, por acción de la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa que se localiza en el citosol (Hogenboom et al., 2004) el mevalonato se transforma en isopentenil difosfato (IPP), el cual se isomeriza a 3,3-dimetilalil difosfato. Hasta aquí, esta primera parte de la biosíntesis de colesterol se ha denominado “**ruta del mevalonato**” (**Figura 1A**).

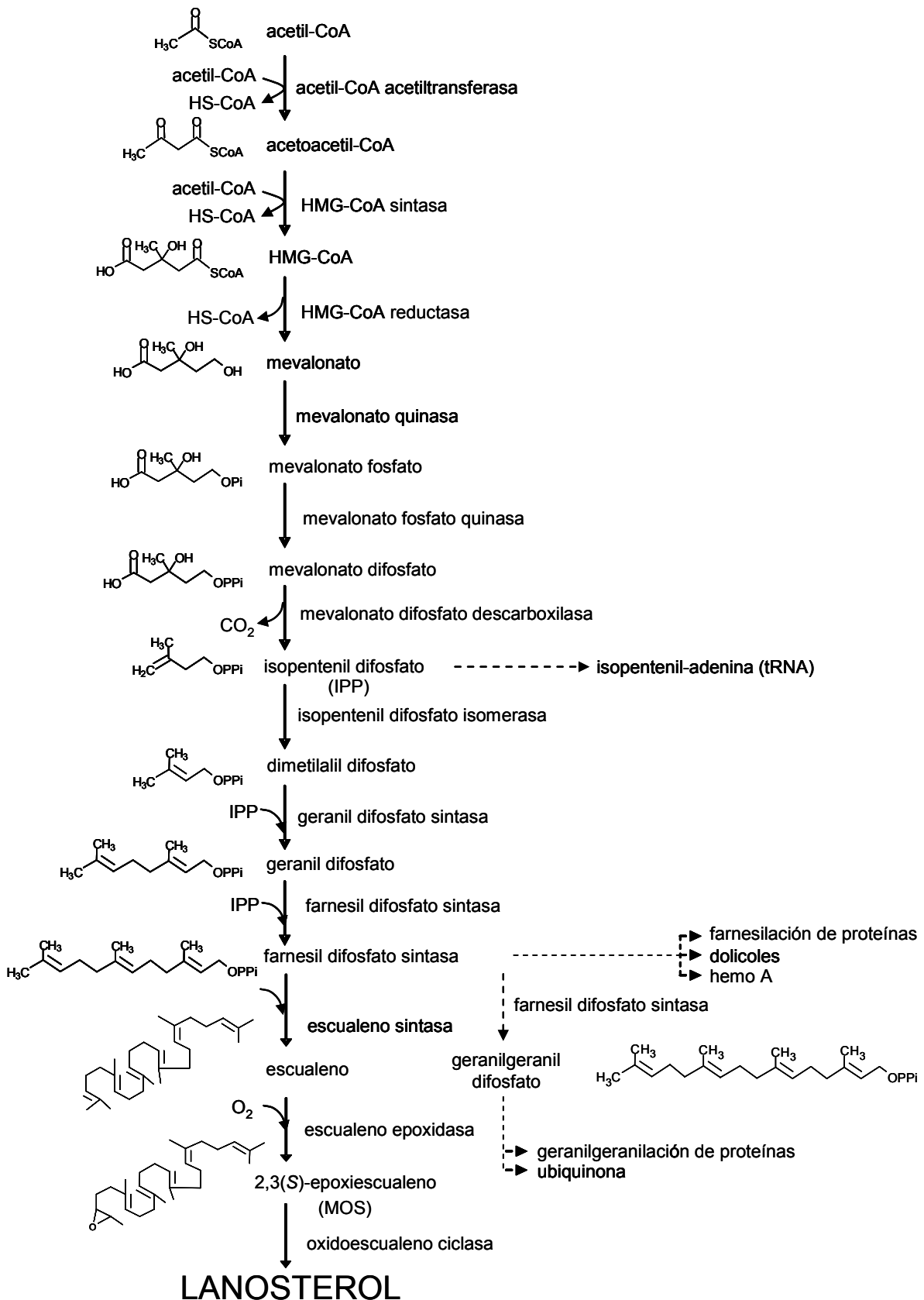
A continuación ambos isómeros se condensan dando lugar a geranil difosfato (GPP). La molécula de GPP se condensa con otra molécula de IPP para dar farnesil difosfato (FPP), a partir de la cual se originan productos no esteroídicos con gran relevancia en diversos procesos celulares. La condensación de dos moléculas de FPP da lugar al escualeno, que se cicla formando lanosterol, primer esteroide de la ruta (**Figura 1A**). La ciclación del escualeno viene precedida por la formación de un epóxido (2,3-epoxiescualeno) a cargo de la escualeno epoxidasa (Chugh et al., 2003; Belter et al., 2011). Esta reacción de oxigenación tiene interés evolutivo pues marca la aparición del oxígeno en la atmósfera. A continuación tiene lugar la ciclación propiamente dicha catalizada por la 2,3-oxidoescualeno ciclasa para formar lanosterol (**Figura 1A**).

La transformación del lanosterol en colesterol (**Figura 1B**) se realiza a través de 18 reacciones enzimáticas de reducción, desmetilación y cambio de posición de dobles enlaces (Schroepfer, 1982). Este proceso puede discurrir por dos vías: la **vía de Bloch**, también conocida como “**insaturada**” por la presencia en todos los componentes de un doble enlace entre C24 y C25 o la **vía de Kandutsch-Russell** o “**saturada**”, que se inicia al convertirse el lanosterol en dihidrolanosterol (DHL) por acción de la esteroide  $\Delta^{24}$ -reductasa (DHCR24) (Schroepfer, 1982). Esta enzima tiene mayor afinidad por el colestano-7,24-dien-3 $\beta$ -ol, seguido por el zimosterol, el desmosterol y el lanosterol (Bae and Paik, 1997). Esto implicaría que la vía preferente sería la insaturada hasta el colestano-7,24-dien-3 $\beta$ -ol, éste se reduce a lanosterol, sustrato de la  $\Delta^5$ -desaturasa que lo transforma en 7-deshidrocolesterol (7DHC), y seguiría la ruta por la vía saturada hasta

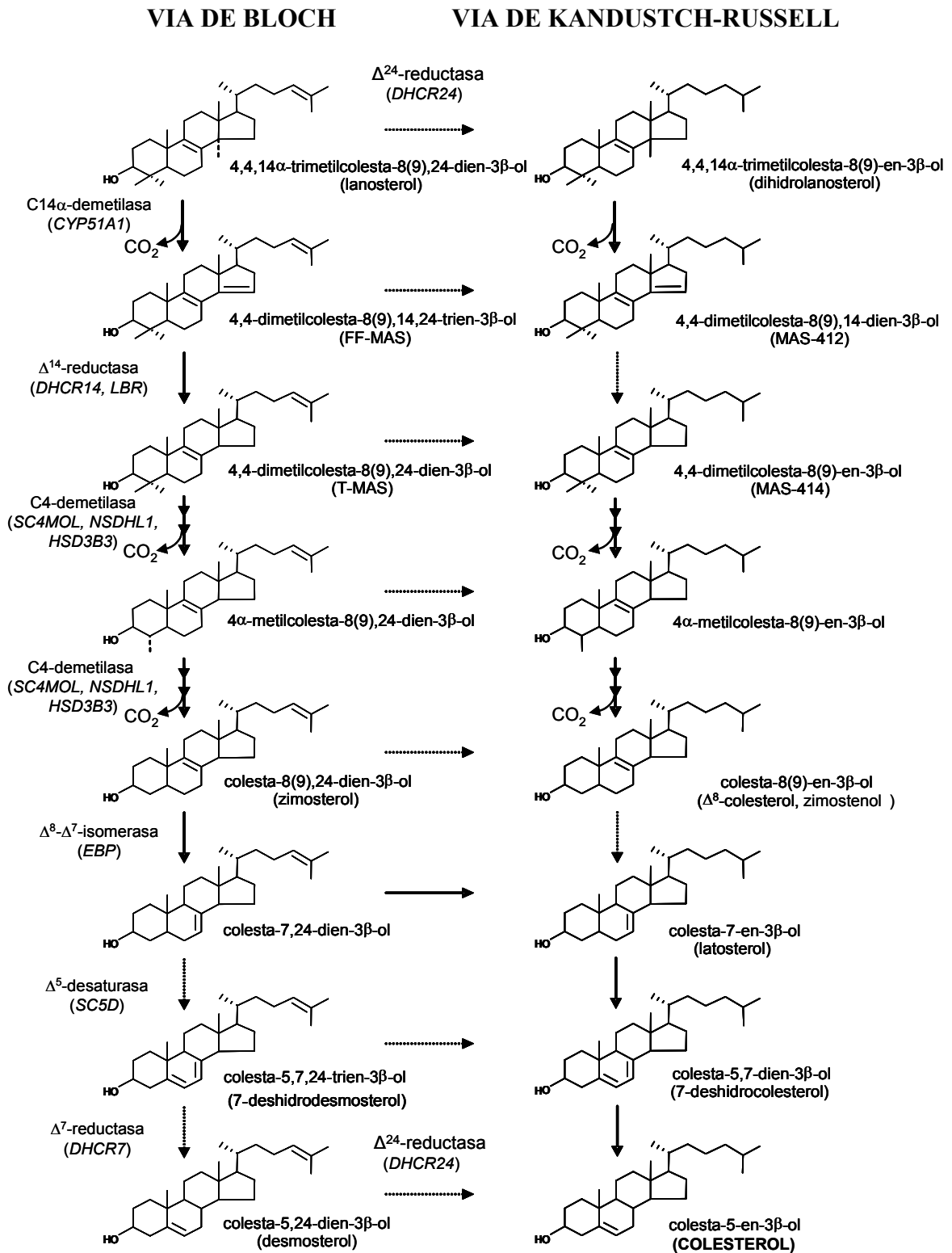


colesterol (**Figura 1B**). No obstante, el paso en el que actúa dicha enzima puede variar de un tipo celular a otro. Por ejemplo, se conoce que las células nerviosas, las células de la retina o los espermatozoides tienen una gran cantidad de desmosterol, lo que implica una preferencia por la vía insaturada hasta el final (Pratt et al., 1980; Cenedella, 1983; Hitzemann and Johnson, 1983; Cross, 2003).

Ciertos intermediarios de la ruta de biosíntesis del colesterol están implicados en otras funciones celulares. Así, por ejemplo, el FPP se utiliza para la biosíntesis de productos no esteroídicos como el grupo hemo, los dolicoles que se requieren para la glicosilación de proteínas y las ubiquinonas implicadas en la respiración mitocondrial (Edwards and Ericsson, 1999). El FPP y el geranylgeraniol difosfato son necesarios para la prenilación de proteínas (Edwards and Ericsson, 1999). Algunos intermediarios esteroídicos también juegan papeles importantes en la fisiología celular. Así, el FF-MAS y el T-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol* y *testicule meiosis activating sterol*, respectivamente) estimulan la meiosis en gónadas. FF-MAS, concretamente, promueve la transición de metafase I a metafase II en oocitos *in vitro*, facilitando la maduración de los mismos (Marin Bivens et al., 2004). En consonancia con ello, la actividad de la lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa, que permite la síntesis de estos compuestos, varía a lo largo de la gametogénesis (Rozman et al., 2005). Por otra parte, el esteroide intermediario inmediatamente anterior al colesterol, el 7DHC, es también precursor de vitamina D<sub>3</sub>. El lanosterol y DHL promueven la ubiquitinación de la HMG-CoA reductasa (Song et al., 2005). El desmosterol y los 4,4-dimetilesteroles son ligandos de los receptores LXR (*liver X receptor*) (Janowski et al., 1996; Yang et al., 2006), que regulan la transcripción de genes implicados en el metabolismo de lípidos y otros procesos (Tontonoz, 2011).



**Figura 1A. Ruta de biosíntesis del colesterol desde acetil-CoA hasta lanosterol.** En el esquema se indican los compuestos sintetizados en las distintas reacciones, así como las enzimas que las catalizan. Abreviaturas: CoA, Coenzima A; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A.



**Figura 1B. Ruta de biosíntesis de colesterol desde el lanosterol hasta el colesterol** donde se indica la bifurcación de la ruta en la vía de Bloch y Kandustch-Russell, los intermediarios sintetizados en las reacciones que tienen lugar, así como las enzimas encargadas de catalizarlas.

### 1.2. Captación del colesterol de las lipoproteínas

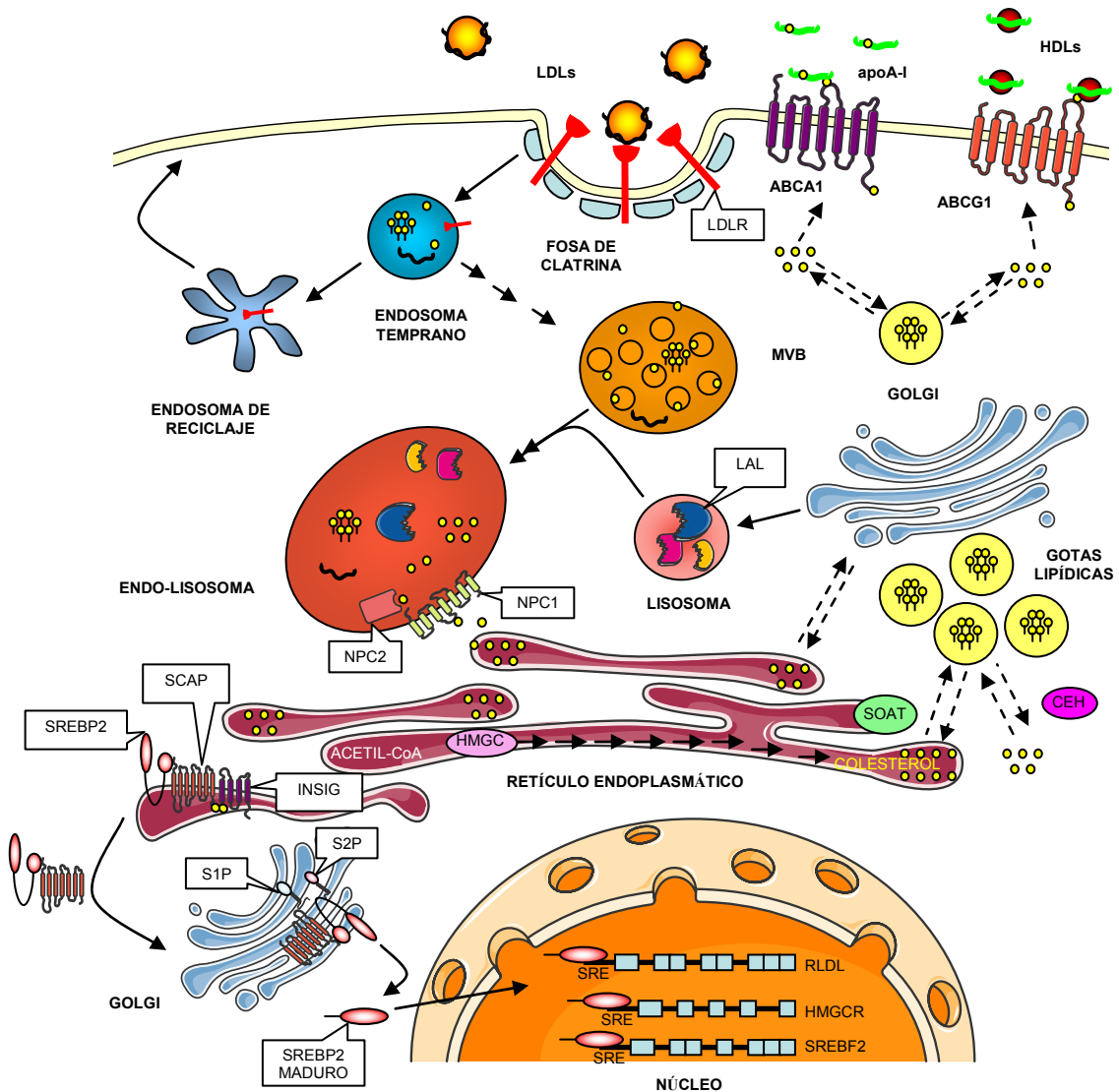
Otra vía de abastecimiento de colesterol para las células es la utilización de las lipoproteínas plasmáticas (Goldstein and Brown, 1982). El colesterol que proviene de la dieta es absorbido en el intestino delgado y transportado al hígado, desde donde es repartido al resto del organismo a través de las lipoproteínas. Los enterocitos captan los lípidos presentes en la luz del intestino, los reesterifican y los empaquetan junto con la apolipoproteína B-48 (apoB-48) y otras apolipoproteínas formando los quilomicrones. Estas lipoproteínas contienen principalmente triglicéridos, así como colesterol libre y esterificado, fosfolípidos en menor proporción (Grundy, 1983). Los quilomicrones son vertidos al sistema linfático y de ahí al torrente sanguíneo, donde van a ser modificados por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima presente en la superficie de las células endoteliales que hidroliza los triglicéridos transportados en las lipoproteínas, liberando ácidos grasos que serán utilizados por las células de los tejidos subyacentes. Tras el catabolismo de los quilomicrones se generan los remanentes de quilomicrones (Grundy, 1983), que son retirados rápidamente de la circulación mediante su captación por el hígado a través de distintos receptores. Los remanentes de quilomicrones son una fuente adicional de colesterol (principalmente esterificado) para el hígado, cuyas células lo utilizan para distintos fines: formación de membranas, biosíntesis de ácidos biliares, formación de lipoproteínas o almacenamiento en el citoplasma en forma de gotas lipídicas (Grundy, 1983). Las principales lipoproteínas que segregan los hepatocitos son las de muy baja densidad (VLDL) (Groszek and Grundy, 1978), que son ricas en triglicéridos y contienen apoB-100 – proteína que confiere estabilidad a la partícula (Pan et al., 2002). Al igual que los quilomicrones, las VLDL sufren un intenso metabolismo en el plasma: los triglicéridos son hidrolizados por acción de la LPL, intercambian triglicéridos por ésteres de colesterol con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) por acción de la CETP (*cholesteryl-ester transfer protein*) y ceden fosfolípidos y distintas apolipoproteínas (apoC y apoE) a otras lipoproteínas (Glomset and Norum, 1973; Glomset et al., 1974), transformándose en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Parte de estas lipoproteínas son eliminadas del plasma por el hígado a través del LDLR. El resto sigue su metabolismo en el plasma y se transforman finalmente en LDL. Estas lipoproteínas contienen ésteres de colesterol como lípido mayoritario y apoB-100 como única apolipoproteína. Las LDL se constituyen en una reserva circulante de colesterol y son utilizadas por las células cuando estas lo requieren (Grundy, 1983).

La principal vía de captación de las LDL por las células es la mediada por el LDLR, que reconoce la apoB-100 (Brown and Goldstein, 1976). El LDLR está presente en las fosas de clatrina en la superficie celular (**Figura 2**). La invaginación de esas fosas inicia la endocitosis, formándose vesículas que se dirigen hacia el compartimento ácido intracelular (Brown and Goldstein, 1986). Las vesículas pierden su cubierta de clatrina y se fusionan con los endosomas tempranos (EE) (Huotari and Helenius, 2011). La LDL se disocia del receptor en el EE, debido a un cambio de pH propiciado por el propio LDLR. El receptor y otras proteínas se localizan en extensiones tubulares de los EE que se escinden formando unas nuevas vesículas que se reciclan directamente a la membrana plasmática o se fusionan con los endosomas de reciclaje (**Figura 2**) (Soccio and Breslow, 2004). Los endosomas de reciclaje transportan de nuevo al LDLR a la membrana plasmática, mediante un mecanismo en el que participan las Rab GTPasas como Rab8 y Rab11 (Holtta-Vuori et al., 2002; Linder et al., 2007). La partícula de LDL prosigue la vía endocítica y se procesa en los endosomas tardíos/lisosomas (endo-lisosomas) (**Figura 2**). En la transición de los endosomas tempranos a endosomas tardíos, se produce una acidificación del lumen del endosoma y se forman vesículas intraluminales enriquecidas en colesterol y ácido lisobifosfatídico (LBPA) (Kobayashi et al., 1998; Mobius et al., 2003), hasta dar lugar al endosoma tardío o cuerpo multivesiculado (MVB) (Huotari and Helenius, 2011). Por último los endosomas tardíos se fusionan con los lisosomas procedentes del Golgi, que contienen enzimas hidrolíticas, que degradan el contenido del endosoma tardío (Soccio and Breslow, 2004). La fusión de los lisosomas con otras organelas está controlado por una proteína presente en su membrana, denominada LAMP2 (Ruivo et al., 2009), habiéndose demostrado que los fibroblastos knockout (KO) para esta proteína sufren una acumulación de colesterol libre en los endo-lisosomas (Eskelinen et al., 2004). El colesterol esterificado presente en las LDL es hidrolizado por la lipasa ácida lisosomal dando lugar a colesterol libre (Brown and Goldstein, 1986); el resto de componentes de la LDL son hidrolizados por otras enzimas lisosomales. La salida del colesterol libre del endo-lisosoma hacia los distintos orgánulos subcelulares tiene lugar por la acción de dos proteínas: NPC1 y NPC2 (*Niemann-Pick disease* tipo C1 y tipo C2) (**Figura 2**) (Ory, 2004). El mecanismo no se conoce exactamente pero se ha propuesto que NPC2, una proteína soluble presente en el lumen del endo-lisosoma, toma el colesterol y lo trasfiere a NPC1, que es una proteína transmembrana, la cual transporta finalmente el colesterol al exterior del endo-lisosoma (Wang et al., 2010). La deficiencia de cualquiera de estas

proteínas desencadena la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, que se caracteriza por la acumulación de colesterol libre en el endo-lisosoma (Ory, 2004).

El colesterol libre debe dirigirse a los distintos compartimientos donde vaya a ser utilizado. Para ello, el colesterol puede viajar por la célula formando parte de las membranas de vesículas transportadoras (Maxfield and Wustner, 2002), pero el transporte mayoritario no es vesicular sino que está mediado por distintas proteínas, como caveolina, SCP-2 (*sterol carrier protein 2*), ORP (*oxysterol-binding protein-related protein*) y proteínas con dominios START [*StAR (steroidogenic acute regulatory protein)-related lipid transport*] (Soccio and Breslow, 2004; Maxfield and Mondal, 2006). El colesterol también puede ser almacenado en forma de colesterol esterificado junto con triglicéridos y otros lípidos en el citosol, formando gotas lipídicas (**Figura 2**). La reesterificación del colesterol ocurre en el RE, gracias a la acción de la SOAT (*sterol O-acyltransferase*, anteriormente denominada ACAT - *acyl-CoA acyl transferase*) (Chang et al., 1997). Los ésteres de colesterol de las gotas lipídicas pueden ser hidrolizados por la CEH (*cholesteryl ester hydrolase*), dando lugar a colesterol libre y un ácido graso.

Otro método de captar colesterol de las lipoproteínas es a través de la familia de los receptores *scavenger* (SR). Atendiendo a la estructura hay ocho clases diferentes de SR (A-H) (van Berkel et al., 2005). Los SR-A son receptores capaces de unirse a LDL modificadas, se ha demostrado que macrófagos deficientes en SR-A tienen una reducción del 80% en la captación de LDL acetiladas y un 50% en la captación de LDL oxidadas (Suzuki et al., 1997). La familia de los SR-B incluye diferentes proteínas multifuncionales, que son capaces de unirse a LDL nativas, modificadas y a las HDL (Calvo et al., 1997). Cabe destacar el papel crítico del SR-BI (receptor *scavenger* clase B tipo I) en el metabolismo de las HDL (Acton et al., 1996; Rigotti et al., 2003; Rhoads and Brissette, 2004). Las células pueden abastecerse de colesterol a través del SR-BI, ya que media la captación selectiva de los ésteres de colesterol y otros lípidos a partir de las partículas de HDL (Rigotti et al., 2003). Por todo ello los SR-BI se expresan en tejidos con una gran demanda de colesterol como el hígado o tejidos esteroideogénicos (Acton et al., 1996; Landschulz et al., 1996; Rigotti et al., 1996).



**Figura 2. Homeostasis intracelular del colesterol. Las células de los mamíferos sintetizan colesterol a partir de acetil-CoA en el retículo endoplasmático.** El colesterol sintetizado puede ser transportado a otras membranas subcelulares o puede ser esterificado por la SOAT (*sterol O-acyltransferase*) y así ser acumulado en el citoplasma en gotas lipídicas. Además las células son capaces de captar el colesterol transportado por las lipoproteínas, especialmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL son internalizadas a través del receptor de LDL (LDLR) y son transportadas hasta los endosomas tempranos, desde allí el LDLR se recicla a la membrana y el resto de componentes continúan la vía endocítica hasta los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares (MVB) que se fusionan con los lisosomas formando los endolisosomas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan en los endolisosomas debido por la acción de la lipasa ácida lisosomal (LAL). La salida del colesterol del endolisosoma se realiza principalmente por la acción de las proteínas NPC1 y NPC2 (*Niemann-Pick disease*). El exceso de colesterol se exporta desde el interior celular hacia aceptores extracelulares como las lipoproteínas de alta densidad (HDL) o la apolipoproteína A-I (apoA-I) gracias a la acción de los transportadores de membrana ABCA1 y ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter A1 y G1*). La biosíntesis de colesterol y su captación a través del LDLR, está regulada principalmente por la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP)-2. Así en ausencia de colesterol el complejo SREBP-2-SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*) se libera de su unión a INSIG y se transporta al Golgi, allí SREBP-2 sufre una doble hidrólisis por parte de S1P y S2P lo que genera una forma madura que se transloca al núcleo favoreciendo la expresión de genes como los que codifican para LDLR, HMGCR (HMG-CoA reductasa) o la propia SREBP-2. En presencia de colesterol INSIG retiene el complejo SREBP-2-SCAP en el retículo endoplasmático.

### 1.3. Sálida del colesterol celular

La salida (también denominada eflujo) de colesterol es fundamental para la homeostasis intracelular del colesterol, ya que previene la acumulación excesiva de colesterol en la célula. Las células de mamífero no pueden degradar el anillo de colestano. El colesterol del organismo es excretado a las heces directamente como tal o tras su conversión a sales biliares. Una pequeña parte es transformado en hormonas esteroideas y se eliminan por la orina. Así pues, el exceso de colesterol en las células de los tejidos periféricos debe ser transportado al hígado para su eliminación final. Este proceso se denomina clásicamente transporte reverso de colesterol (TRC) (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012).

La célula se deshace del exceso de colesterol mediante difusión pasiva o por difusión facilitada y es recogido por las apolipoproteínas (Oram and Yokoyama, 1996; Yokoyama, 1998; Yokoyama, 2000). La difusión pasiva consiste en el intercambio de colesterol entre la membrana celular y las HDL. Las HDL son pequeñas lipoproteínas que contienen fosfolípidos, ésteres de colesterol y apolipoproteínas apoA-I y apoA-II mayoritariamente (Grundy, 1983). Muchos factores parecen estar involucrados en el proceso de difusión pasiva, como la estructura de las HDL o los distintos compartimentos de la membrana plasmática.

El mecanismo mejor conocido es el mediado por la proteína celular ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A*), que cede colesterol a la apoA-I, apolipoproteína mayoritaria de las HDL (**Figura 2**). ABCA1 pertenece a la familia de las *ATP-binding cassette proteins*, una familia de proteínas que juegan un papel fundamental en el transporte de sustancias hidrofóbicas. El primer miembro identificado de la familia fue MDR1 (*multi-drug transporter 1*) ahora denominado ABCB1 (Chen et al., 1986; Ueda, 1997), cuya sobreexpresión confiere resistencia a múltiples drogas (Gros et al., 1986; Ueda et al., 1987). Las proteínas de la familia ABC han sido clasificadas clásicamente como bombas para la eliminación de xenobióticos del interior de la célula, pero actualmente se conoce que esa es sólo una de sus múltiples funciones (Ueda, 2011). Aparte de la clasificación por el dominio funcional, los miembros de esta familia presentan una gran heterogeneidad de funciones, por ello las proteínas de la familia ABC se clasifican en tres grupos atendiendo a su función: transportadores, reguladores y canales (Ueda, 2011). Muchos de los miembros de esta familia participan en el transporte de lípidos (Ueda, 2011) como es el caso de ABCA1.



Se han propuesto varios mecanismos para explicar la transferencia de colesterol facilitada por ABCA1 a las apoA-I. Uno de ellos sugiere que la apoA-I forma complejos con los fosfolípidos y el colesterol en la superficie celular, posteriormente es internalizada y llevada a distintos compartimentos celulares donde se produce su lipidación (Takahashi and Smith, 1999; Neufeld et al., 2001). Vedhachalam y colaboradores proponen que varias moléculas de apoA-I se unen a ABCA1, la cual facilita la transferencia de fosfolípidos a las apoA-I provocando una tensión en la membrana plasmática. Para aliviar esta tensión, se forman exovesículas que son finalmente solubilizadas por la apoA-I formándose HDL nacientes. De esta manera, la apoA-I extraería fragmentos de membrana celular que contienen fosfolípidos y colesterol (Vedhachalam et al., 2007; Nandi et al., 2009).

Las HDL nacientes siguen recogiendo el colesterol sobrante de las células y se van transformando progresivamente. Se ha demostrado que otros transportadores de la familia de las ABC pueden mediar la transferencia de colesterol desde el interior de las células hacia las HDL, como las proteínas ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter G1*), ABCG4 y heterodímeros de ABCG1/ABCG4 (Gelissen et al., 2006; Vaughan and Oram, 2006). El colesterol recién recogido y ubicado en la superficie de la HDL es esterificado por acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), una enzima que circula asociada a las HDL. El éster de colesterol resultante, mucho más apolar que el colesterol libre, se ubica en el núcleo de la HDL y progresivamente la partícula va engrosando (Jonas, 2000; Yokoyama, 2000). La LCAT es necesaria para la esterificación del colesterol pero no modula la salida de colesterol desde las células, por cuanto cambios en su actividad no afectan el TRC (Calabresi et al., 2009, Tanigawa et al., 2009).

En el metabolismo posterior de las HDL en el plasma están implicadas otras proteínas, como lipasas hepáticas y endoteliales, CEPT, proteínas transferidoras de fosfolípidos, paraoxonasa, etc. (Fisher et al., 2012).

Las HDL son captadas por el hígado a través del receptor SR-BI principalmente. Una vez en el hepatocito, la mayor parte del colesterol es vertido directamente a la bilis (Botham and Bravo, 1995), por acción de un heterodímero formado por ABCG5/G8 (Berge et al., 2000; Graf et al., 2002; Graf et al., 2003). La activación de LXR en el hígado favorece este mecanismo de eliminación de colesterol al estimular la transcripción de los transportadores ABCG5/G8 (Repa et al., 2002).

### 2. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL

El regulador principal de la homeostasis intracelular del colesterol es el propio colesterol. Ante unos niveles bajos de colesterol, la célula incrementa la biosíntesis de colesterol y la captación de LDL, mediante el incremento de la expresión de enzimas de la ruta de biosíntesis y del LDLR. Cuando los niveles de colesterol intracelular son elevados, la célula reduce la biosíntesis y la captación de LDL, y favorece la salida de colesterol incrementando la expresión de ABCA1 y ABCG1 (Steck and Lange, 2010). El colesterol, sin embargo, no es el único metabolito con acciones reguladoras en este contexto. Por ejemplo, el farnesol y algunos esteroides intermediarios en la ruta de biosíntesis del colesterol y sus derivados oxidados, como el 25-hidroxicolesterol, son capaces de modular la homeostasis del colesterol (Xu et al., 2010).

El mecanismo de regulación del metabolismo del colesterol (y del metabolismo lipídico en general) mejor conocido es el mediado por los factores de transcripción SREBP (*sterol response element binding protein*) (Reynolds et al., 1984; Sudhof et al., 1985; Gil et al., 1986). Algunos receptores nucleares, como LXR, PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) y FXR (*farnesoid X receptor*) tienen un papel más indirecto, pero también afectan la homeostasis del colesterol. Finalmente, algunos microARN (miARN), integran y coordinan el metabolismo lipídico con otros procesos fisiológicos.

#### 2.1. Regulación mediada por el complejo srebp-scrap-insig

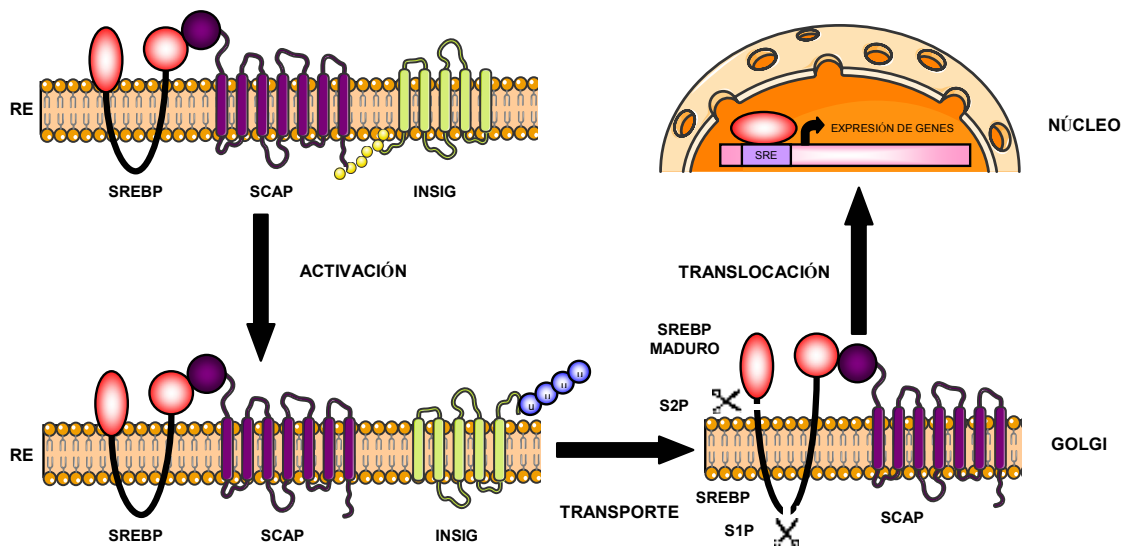
Se conocen tres miembros de la familia de SREBP: SREBP-1a, -1c, que derivan del mismo gen por transcripción desde distintos sitios de iniciación, y SREBP-2. SREBP-1c, al que también se denomina ADD1 (*adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1*), es el factor que predomina en la mayoría de los tejidos animales incluido el hígado (Brown and Goldstein, 1997) y su expresión está estimulada por la insulina (Kim et al., 1998, Shimomura et al., 1999). En células en cultivo, sin embargo, la expresión de SREBP-1c es relativamente baja. Todas ellas participan en la regulación del metabolismo lipídico pero tienen papeles diferenciados. SREBP-1c estimula la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y la esterificación de los mismos (Horton et al., 1998b), mientras que SREBP-2 gobierna la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de colesterol y el LDLR (Kim and

Spiegelman, 1996). SREBP-1a, que es minoritario, parece activar ambas vías (Horton 2003; Pai 1998)

Los SREBP se sintetizan como formas precursoras transcripcionalmente inactivas, que se localizan en el RE formando un complejo con la proteína SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*) (Hua 1996). SCAP consta de dos dominios: uno hidrofílico implicado en procesos de interacción entre proteínas, por el cual se une a SREBP, y otro hidrofóbico en el extremo N-terminal. Este último consta de ocho segmentos transmembrana y se denomina “dominio sensible a esteroides” (SSD), ya que mutaciones en el mismo determinan una pérdida de la regulación por esteroides. Este dominio aparece también en otras proteínas implicadas en el metabolismo, transporte y señalización del colesterol, como la HMG-CoA reductasa o la proteína NPC1 anteriormente comentada. El complejo SREBP-SCAP es retenido en la membrana del RE por acción de las proteínas INSIG (*insulin-induced gene*)-1 e INSIG-2 (Mohn 1991). Estas proteínas tienen la capacidad de unirse al dominio SSD de SCAP, unión que está modulada por el colesterol (Yabe et al., 2002; Yang et al., 2002). La afinidad de INSIG-1 por SCAP es muy alta, mientras que la de INSIG-2 es menor y muestra una estricta dependencia sobre la presencia de esteroides. En cuanto a su expresión, INSIG-1 es ubicua y está activada por SREBP-1c, y ésta a su vez por insulina y LXR (Horton et al., 2002; Janowski, 2002). INSIG-2 puede dar lugar a dos isoformas: INSIG-2a, cuya expresión es exclusivamente hepática y está inhibida por la insulina, e INSIG-2b, de expresión ubicua y constitutiva (Yabe et al., 2002; Yabe et al., 2003). Estas diferencias determinan que en el hígado, en estado de alimentación, la expresión de INSIG-1 sea elevada y baja la de INSIG-2, todo ello gobernado por la insulina; mientras que en ayunas ocurre lo contrario (Engelking et al., 2005; Goldstein et al., 2006). La degradación de INSIG-1 es más rápida que la de INSIG-2 y se produce cuando disminuye la concentración de colesterol en el RE, que deja libre a INSIG-1, permitiendo su ubiquitinización y degradación por el proteasoma (Gong et al., 2006).

Los SREBP requieren sufrir una hidrólisis parcial para ser activos (**Figura 3**) (Brown and Goldstein, 1997). En ausencia de colesterol, SCAP expone una secuencia de 6 aminoácidos (MELADL); este cambio conformacional provoca que el complejo SREBP-SCAP se libere de INSIG, facilitando su incorporación a las vesículas COPII y, consecuentemente, su traslado al Golgi. Ahí se encuentran las proteasas encargadas del procesamiento de SREBP (DeBose-Boyd et al., 1999). La primera de ellas es S1P

(proteasa del sitio 1) que reconoce la secuencia RSVLS entre los segmentos transmembrana del SREBP y la hidroliza entre una Leu y una Ser. A continuación actúa la proteasa S2P (proteasa del sitio 2) que libera el fragmento N-terminal del SREBP al citosol. Este fragmento será el que finalmente alcance el núcleo donde interactuará con los elementos SRE (elementos de respuesta a esteroides) para estimular la transcripción de los genes diana (**Figura 3**). Finalmente SREBP es degradada por el proteasoma (Sundqvist et al., 2005). Cuando la concentración de colesterol en RE se incrementa, SCAP adopta una configuración que le hace unirse fuertemente a INSIG, con lo cual SREBP queda retenida en el RE y no puede activarse en el Golgi. En esta condición, la expresión de los genes diana de SREBP estarán reprimidos (Brown et al., 2002).



**Figura 3. Control de la biosíntesis de lípidos por la activación proteolítica de SREBP.** Los factores de transcripción SREBP (proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides) son sintetizados como una forma precursora inactiva en el retículo endoplasmático (RE). Allí forman un complejo con SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*) e INSIG (*insulin-induced gen*). En el estado inactivo la interacción de INSIG con SCAP retiene el complejo SCAP-SREBP en el RE. Durante la activación, cuando los niveles de esteroides son bajos, SCAP sufre un cambio en su conformación que lo libera de su unión con INSIG que se ubiquitina para su posterior degradación. SCAP promueve el transporte de SREBP desde el RE al Golgi, a continuación SREBP sufre una proteólisis en dos pasos por la acción de las proteasas específicas del Golgi S1P y S2P, dando lugar a una forma madura de SREBP que sale del Golgi y se transloca al núcleo. En el núcleo activa la expresión de genes que participan en el metabolismo de los lípidos mediante su unión a los SRE (*sterol regulatory element*).

Señalemos, por último, que mientras SCAP reconoce colesterol y otros esteroides, INSIG tiene un sitio de reconocimiento para oxisteroides y, en su presencia, se promueve la unión de INSIG a SCAP. De hecho, los oxisteroides son potentes inhibidores de la activación de SREBP (Sato, 2010). Toda esta complejidad confiere una enorme plasticidad al sistema, conducente a mantener la homeostasis intracelular del colesterol en las distintas situaciones fisiológicas posibles.

### 2.2. Regulación mediada por receptores nucleares

Los receptores LXR actúan como sensores de colesterol produciendo el efecto contrario al que producen los SREBP: disminuyen los niveles de colesterol en la célula mediante la activación de genes para el TRC e incrementan la conversión de colesterol en ácidos biliares (Calkin and Tontonoz, 2010). Su activación se da fundamentalmente por oxisteroides formados durante la biosíntesis de colesterol. Los receptores LXR van a proteger a la célula frente a la sobrecarga de colesterol, activando las vías de salida de este esteroide, mediante el incremento de la expresión de los transportadores ABCA1, ABCG1 y ABCG4 (Zelcer and Tontonoz, 2006). También son dianas de LXR, ABCG5 y ABCG8 que median la excreción de colesterol hacia la bilis en el hígado (Calpe-Berdiel et al., 2008).

Los PPAR son una familia de receptores nucleares (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ ) con un relevante papel en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos (Majdalawieh and Ro, 2010). PPAR $\alpha$ , que se expresa fundamentalmente en el hígado, es un regulador clave en el catabolismo de los ácidos grasos, pues estimula la captación de ácidos grasos por las células y la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal (Ferre, 2004; Pyper et al., 2010). PPAR $\gamma$  acelera el metabolismo de los ácidos grasos e induce el almacenamiento de reservas grasas en el tejido adiposo, mediante la activación de la LPL y de transportadores de ácidos grasos (Huang et al., 2012). PPAR $\beta/\delta$  promueve la oxidación y la termogénesis en tejido adiposo, mientras que en el músculo esquelético favorece el catabolismo de ácidos grasos para el consumo energético local, jugando un papel crucial en la respuesta metabólica al ejercicio físico (Coll et al., 2009). Los PPAR participan en la homeostasis del colesterol al activar la expresión de ABCA1 mediante la estimulación de la expresión de LXR $\alpha$  (Chawla et al., 2001; Chinetti et al., 2001; Oliver et al., 2001).

### 2.3. Regulación post-transcripcional

El metabolismo del colesterol está también regulado a nivel post-transcripcional, por varios mecanismos entre los que se encuentran la degradación y fosforilación de la HMG-CoA reductasa, la degradación del LDLR y la represión post-transcripcional por microARNs (miARN).

Productos intermediarios de la ruta de biosíntesis del colesterol controlan la estabilidad y actividad de la enzima limitante de la ruta, la HMG-CoA reductasa. Se ha observado que el lanosterol y el DHL, primeros esteroides en ser sintetizados, estimulan la degradación de la HMG-CoA reductasa, incluso más que el propio colesterol (Song et al., 2005). La acumulación de lanosterol favorece la unión de la HMG-CoA reductasa a INSIG promoviendo así la ubiquitinización y degradación de la enzima (Song et al., 2005). Además del lanosterol, los oxisteroides también promueven la ubiquitinización y degradación de la HMG-CoA reductasa (Song and DeBose-Boyd, 2004). La actividad de la HMG-CoA reductasa puede ser inhibida por fosforilación de la Ser871, acción que es realizada por la quinasa activada por AMP (AMPK) (Clarke and Hardie, 1990; Hardie and Pan, 2002).

El LDLR también está sujeto a regulación post-transcripcional. PCSK9 (*protein convertase subtilisin/kexin type 9*) se une a LDLR y favorece su degradación en el lisosoma (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012). Se ha observado que los ratones deficientes de PCSK9 poseen un 50% más de actividad LDLR que los ratones control (Rashid et al., 2005). Otra proteína que modula LDLR es IDOL (*inducible degrader of the LDL receptor*), una E3 ubiquitin-ligasa descubierta en el transcurso de una investigación sobre el papel de LXR en la regulación de la actividad del LDLR (Zelcer et al., 2009). Los agonistas del LXR activan la transcripción de IDOL, la cual desencadena la ubiquitinización del dominio citoplasmático del LDLR, favoreciendo su degradación (Zelcer et al., 2009). Los hepatocitos que carecen de IDOL presentan unos mayores niveles proteicos del LDLR, y además captan más LDL que los hepatocitos controles (Zelcer et al., 2009).

### 2.4. Regulación mediada por microARN

Además de los reguladores transcripcionales clásicos, se han identificado miembros de la familia de los ARN no codificantes, denominados microARN (miARN o miR), como importantes reguladores post-transcripcionales de la homeostasis del colesterol (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012). Los miARNs son dobles cadenas de ARN endógenas, de unos 22 nucleótidos que llevan a cabo su función uniéndose por complementariedad de bases a la región 3'UTR de los ARNm diana produciendo la inestabilidad de los mismos o secuestrándolos, inhibiendo su traducción (Bartel, 2009). Cada miARN puede tener múltiples dianas lo que supone que puede regular simultáneamente diferentes genes implicados en una misma ruta metabólica o en diferentes procesos fisiológicos (Pillai et al., 2007; Liu, 2008).

Actualmente se conocen varios miARN implicados en la regulación de la homeostasis del colesterol. Cabe destacar la familia del microARN-33 (miR-33a y b), que están codificados por regiones intrónicas de los genes de *SREBF2* (sterol regulatory element binding transcription factor 2) y *SREBF1* respectivamente, de modo que se sintetizan al tiempo que SREBP2 y SREBP1. Se conocen diferentes dianas de miR-33. Por un lado, inhibe la expresión de ABCA1 y ABCG1, lo que implica un papel regulador del TRC y la biogénesis de HDL (Rayner et al., 2010). También inhibe la expresión de la proteína NPC1 encargada de transportar colesterol desde el lisosoma a otros compartimientos celulares (Rayner et al., 2010), así como la expresión de IRS2 (*insulin receptor substrate 2*) y de diversas enzimas implicadas en la oxidación de los ácidos grasos (Dávalos et al., 2011). También se ha demostrado un papel de miR-33 en la progresión del ciclo celular (Cirera-Salinas et al., 2012). Aparte de miR-33, otros varios miARN han sido descritos como reguladores post-transcripcionales de ABCA1, como miR-758 (Ramírez et al., 2011) y miR-106b (Kim et al., 2012). Finalmente, otro miARN importante en la homeostasis del colesterol es miR-122, un ejemplo de miARN tejido específico que se expresa únicamente en el hígado y supone más del 70% de miARN en este tejido (Lagos-Quintana et al., 2002). Se ha demostrado que la inhibición de su expresión reduce la biosíntesis de colesterol y disminuye la concentración plasmática de colesterol un 25-30% (Esau et al., 2006).

### 3. PAPEL DEL COLESTEROL EN LA HOMEOSTASIS DE OTROS METABOLISMOS

Como hemos comentado anteriormente, la cantidad de colesterol en la célula es el principal factor regulador de la homeostasis del colesterol, pero además los niveles intracelulares de colesterol tienen una repercusión en otros metabolismos. Estas otras acciones reguladoras del colesterol están mediadas por los factores de transcripción SREBP y LXR, así como por ciertos miARNs.

#### 3.1. Metabolismo de los ácidos grasos

SREBP-1c tiene un importante papel en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos en los diversos tejidos (Shimomura et al., 1997). SREBP-1c controla la transcripción de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (ATP-citrato liasa - ACL; acetil-CoA carboxilasa - ACC; ácido graso sintasa - FASN), la modificación de los ácidos grasos (estearoil-CoA desaturasa - SCD; ácido graso elongasa - ELOVL) y la formación de triglicéridos (gliceraldehído-3-fosfato aciltransferasa - GPAT; diacilglicerol- aciltransferasa - DGAT), entre otros; (Horton et al., 1998b; Shimomura et al., 1998; Horton et al., 2002).

Como hemos indicado anteriormente, la maduración de SREBP-1c a partir de su precursor inactivo se produce mediante un proceso que está modulado, entre otros factores, por los niveles de colesterol en la membrana del RE. Por su parte, la expresión de SREBP-1c a nivel de ARNm, está regulada por LXR, que puede ser activado por los oxisteroles que se forman durante la biosíntesis de colesterol. Repa y colaboradores demostraron que en animales que carecían de LXR, se producía una menor expresión de SREBP-1c (Repa et al., 2000). A su vez, la insulina estimula el efecto de LXR sobre la expresión de SREBP-1c (Horton et al., 1998a; Shimomura et al., 2000; Chen et al., 2004; Sampath et al., 2007), de modo que las ratas tratadas con estreptozotocina, un compuesto que destruye específicamente las células  $\beta$  del páncreas, tienen reducido los niveles de ARNm de SREBP-1c y los niveles de proteína, tanto de la forma precursora como la activa (Shimomura et al., 1999).

Un mecanismo adicional de regulación e integración entre distintos metabolismos son los miARN. Se ha descrito recientemente el control de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos por parte del miR-33b (Dávalos et al., 2011). Dado que este miARN está codificado por una región intrónica en el gen de *SREBF1* y, por tanto, se



sintetiza al tiempo que se expresa SREBP-1, puede anticiparse que en las situaciones donde se estimula la biosíntesis de ácidos grasos (por mediación de SREBP-1c) se inhibe su oxidación (por mediación de miR-33b).

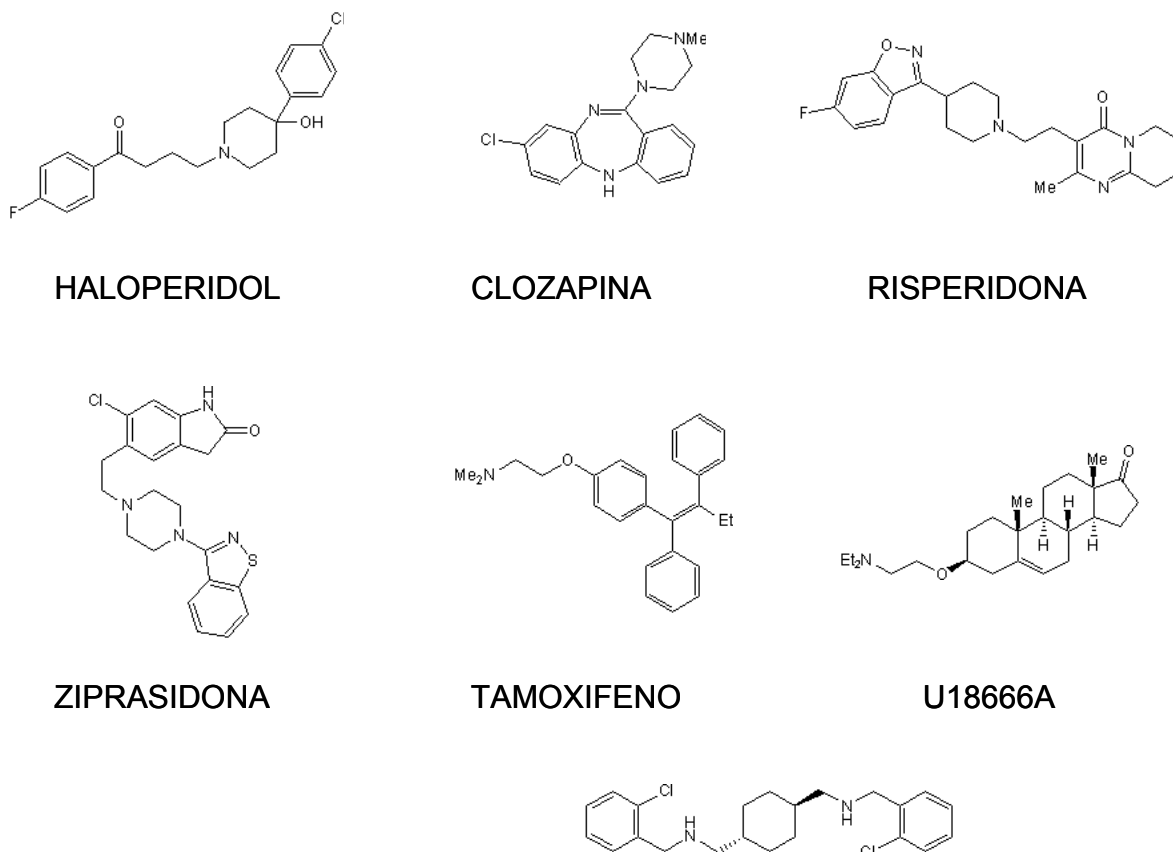
### 4. ANTIPSICÓTICOS

Desde la introducción de los antipsicóticos de primera generación (FGA; Clorpromacina y Haloperidol) en 1950, los antipsicóticos se han convertido en fármacos indispensables para el tratamiento de la esquizofrenia y otras enfermedades psiquiátricas. Desafortunadamente, algunos de los antipsicóticos más usados, particularmente los antipsicóticos de segunda generación (SGA), producen efectos metabólicos indeseables como obesidad, hipertrigliceridemia, desajustes en el metabolismo de la glucosa y en ciertos casos, incremento de los niveles de colesterol en el suero (Meyer and Koro, 2004; Newcomer et al., 2008). Estos efectos adversos suponen el mayor desafío en el tratamiento de los trastornos psiquiátricos, ya que reducen la conformidad de los pacientes al tratamiento y contribuyen al incremento del riesgo cardiovascular (Newcomer and Hennekens, 2007). A pesar de estos inconvenientes, más frecuentes con los SGA, estos antipsicóticos son más utilizados que los FGA por su mayor eficacia terapéutica (Buchanan et al., 2010).

#### 4.1. Acción terapéutica de los antipsicóticos

La hiperactividad de los receptores de dopamina en el sistema mesolímbico produce los síntomas de la psicosis (Serretti et al., 2004; Abi-Dargham and Laruelle, 2005). En coherencia con ello, el bloqueo de los receptores en esta vía supone la mejoría de los síntomas (Serretti et al., 2004). Los antipsicóticos tienen distintas estructuras químicas, que van a condicionar su potencia clínica (Figura 4), dependiendo de su afinidad por los receptores dopaminérgicos subtipo 2 (D2) además de por otros receptores (Tabla 1).

Los denominados FGA, también denominados antipsicóticos típicos, bloquean los receptores D2 con gran afinidad (Abi-Dargham and Laruelle, 2005) (**Tabla 1**), lo cual es terapéuticamente ventajoso. Sin embargo, el bloqueo de estos receptores en las regiones mesocorticales y nigroestriatal, produce efectos motores indeseados que reducen el interés terapéutico de estos fármacos (Oakley et al., 1991; Tandon and Jibson, 2002; Conley and Kelly, 2005).



**Figura 4. Estructura química de algunas aminas anfipáticas** como los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona), el tamoxifeno, el U18666A y el AY9944.

Desde un punto de vista farmacológico, los SGA o antipsicóticos atípicos, no sólo son capaces de atenuar los síntomas de la psicosis, sino que además, tienen menores efectos motores indeseados (Conley and Kelly, 2005). Esto se debe a que los SGA, además de bloquear los receptores D2, también bloquean los receptores de serotonina 2A (5HT<sub>2A</sub>) entre otros receptores (Meltzer et al., 1989) (**Tabla 1**). Se piensa que el bloqueo de los receptores 5HT<sub>2A</sub> en las regiones mesocorticales y nigroestriatal, compensa la deficiencia en la actividad de los receptores de dopamina, lo que produce una mejoría de los síntomas no deseados (Meltzer et al., 1989; Stahl, 1998; Meltzer, 1999; Bubser et al., 2001).

Receptor	FGA			SGA		
	Haloperidol	Clozapina	Olanzapina	Quetiapina	Risperidona	Ziprasidona
<b>D<sub>1</sub></b>	+	+	++	-	+	+
<b>D<sub>2</sub></b>	++++	+	++	+	+++	+++
<b>D<sub>3</sub></b>	+++	+	+	-	++	++
<b>D<sub>4</sub></b>	+++	++	++	-	-	++
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	-	-	-	-	-	+++
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	-	-	-	-	+	+++
<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	+	+++	+++	++	++++	++++
<b>5-HT<sub>2C</sub></b>	-	++	++	-	++	++++
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	-	++	++	-	-	+
<b>5-HT<sub>7</sub></b>	-	++	-	-	+++	++
<b>α<sub>1</sub></b>	+++	+++	++	+++	+++	++
<b>α<sub>2</sub></b>	-	+	+	-	++	-
<b>H<sub>1</sub></b>	-	+++	+++	++	-	-
<b>m<sub>1</sub></b>	-	++++	+++	++	-	-
<b>transportador DA</b>		++	++			
<b>transportador NA</b>		+	++			++
<b>transportador 5-HT</b>						++

- mínima o nada; + = baja; ++ = moderada; +++ = alta; ++++ = muy alta

**Tabla 1. Afinidad relativa de los antipsicóticos por los receptores de neurotransmisores, a dosis terapéuticas.** (Adaptada y modificada de Miyamoto y colaboradores (Miyamoto et al., 2005).

### 4.2. Efectos metabólicos de los antipsicóticos

El tratamiento con la mayoría de los SGA se asocia con ganancia de peso, hipertrigliceridemia, hiperglucemia, diabetes tipo II, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular, hiperprolactinemia e hipertensión (Allison et al., 1999; Jones et al., 2001; Wetterling, 2001; Gardner et al., 2005; Holt and Peveler, 2006; Mathews and Muzina, 2007; Han et al., 2008; Parsons et al., 2009). Los FGA también están asociados con desórdenes metabólicos pero su efecto es más moderado (Gardner et al., 2005; Holt and Peveler, 2006; Mathews and Muzina, 2007; Bobo et al., 2010).

En cuanto al peso corporal, en un estudio realizado para evaluar el tratamiento a corto plazo (10 semanas) con antipsicóticos a dosis estándar, se observó un incremento en el peso medio con clozapina > olanzapina > risperidona > haloperidol en este orden (Allison et al., 1999). En la fase I del estudio CATIE (*Clinical Antipsychotic Trials of Interventions Effectiveness*) en pacientes tratados a largo plazo con SGA se observó los siguientes incrementos del peso corporal: 30% con olanzapina, 16% con quetiapina, 14% con risperidona y 7% con ziprasidona (Lieberman et al., 2005). En pacientes que nunca habían sido tratados con antipsicóticos, a las diez semanas de comenzar el tratamiento con clorpromacina o risperidona, presentaban un incremento del 8% en el peso corporal (Zhang et al., 2004). Un incremento más significativo del peso corporal se observó en pacientes tratados por primera vez con risperidona u olanzapina tras tres y nueve meses, del 10% y del 18% respectivamente (Templeman et al., 2005). Resultados similares se han obtenido en estudios a largo plazo, con pacientes tratados en el primer brote psicótico con olanzapina o haloperidol, observándose un incremento del peso corporal medio de 13.9 y 6.3 kg respectivamente (Kahn et al., 2008). Usando modelos animales, se ha demostrado que tras dos semanas de tratamiento con olanzapina y haloperidol en ratas macho, también se producía un incremento del peso corporal con respecto a las no tratadas (controles) (Minet-Ringuet et al., 2006). Se ha propuesto que la ganancia de peso se debe a un incremento del apetito, debido al efecto agonista de los antipsicóticos sobre los receptores de Histamina H<sub>1</sub> (Teff and Kim, 2011). Los estudios de Ferno y colaboradores en ratas hembra van en este sentido y proponen que la ganancia de peso observada tras el tratamiento con olanzapina se debe a la alteración en el control de la saciedad, produciéndose un incremento en la ingesta de comida en los animales tratados (Ferno et al., 2011).

Otro de los efectos no deseados producidos por los antipsicóticos es la alteración en la homeostasis de la glucosa. La prevalencia de diabetes en pacientes con esquizofrenia es dos veces mayor que en la población en general (Mathews and Muzina, 2007), y el riesgo de sufrir diabetes se incrementa después del tratamiento con SGA (Holt and Peveler, 2006) y también con FGA pero menos (10%) (Sernyak et al., 2002). En otros estudios se ha demostrado que la olanzapina y la risperidona también incrementan el riesgo de padecer diabetes en 6 y 2 veces respectivamente, con respecto a personas no tratadas (Koro et al., 2002). En estudios retrospectivos se ha encontrado que los individuos tratados con olanzapina o con clozapina tienen el mayor riesgo de diabetes, sobre todo en pacientes jóvenes (Sernyak et al., 2002). Lindenmayer y colaboradores observaron en un estudio con 157 pacientes que los tratados con clozapina, olanzapina y haloperidol tenían un incremento de los niveles de glucosa en plasma (Lindenmayer et al., 2003). Estos cambios en la homeostasis de la glucosa también han sido observados en ratas tras la administración aguda de clozapina y de olanzapina. Las ratas tratadas también mostraron una activación de los genes implicados en la gluconeogénesis en el hígado y cambios en los niveles de glucagón, en comparación con ratas controles (Jassim et al., 2012).

También se han encontrado cambios en la sensibilidad a la insulina en los pacientes tratados con antipsicóticos. Se ha demostrado que el haloperidol produce resistencia a la insulina en base a los índices habituales (Baptista et al., 2001). Girault y colaboradores observaron que la olanzapina produce resistencia a la insulina en hígado y en tejidos periféricos de la rata (Girault et al., 2012). En cambio, algunos antipsicóticos parecen no tener efectos sobre la homeostasis de la glucosa, como sucede con el aripiprazol y la ziprasidona (Yogarathnam et al., 2013).

En los pacientes tratados con antipsicóticos también se encuentran perturbaciones en el metabolismo lipídico (McIntyre et al., 2001). La concentración de triglicéridos en plasma es la variable más afectada (Holt and Peveler, 2006) aunque hay diferencias importantes según el antipsicótico de que se trate (Meyer et al., 2008; Newcomer, 2008; Correll et al., 2009). Los SGA parecen ser los más potentes en el desarrollo de hiperlipidemia (Gardner et al., 2005; Holt and Peveler, 2006). En pacientes adultos con esquizofrenia tratados con clozapina u olanzapina, se ha observado un incremento del colesterol total, en contraposición a los tratados con haloperidol o risperidona (Lindenmayer et al., 2003). En pacientes jóvenes tratados por

primera vez con olanzapina se ha visto un incremento del colesterol total y de colesterol-LDL, pero no en los tratados con aripiprazol, quetiapina o risperidona (Correll et al., 2009). Por otro lado, en sujetos tratados con olanzapina se encontró un gran incremento en los niveles de colesterol y triglicéridos en las VLDL, en comparación con los tratados con risperidona (Smith et al., 2010). Por último, un estudio dirigido a examinar la expresión de genes en sangre total, demostró que los pacientes tratados con olanzapina presentan un incremento en la expresión de *FASN* y *SCD* frente a los no medicados (Vik-Mo et al., 2008). Estos cambios en las concentraciones de lípidos en sangre también se han observado en modelos animales. Así, la administración crónica de olanzapina en ratones produce un incremento de los niveles de triglicéridos en suero (Coccurello et al., 2006). Este efecto se atribuye a cambios en la síntesis hepática de lípidos inducidos por los antipsicóticos (Laressergues et al., 2011). En la rata, el tratamiento agudo con clozapina produce un incremento del colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en el hígado (Ferno et al., 2009).

Un aspecto que ha suscitado interés es determinar si los efectos metabólicos inducidos por los antipsicóticos son una consecuencia de la ganancia de peso o bien, si se trata de efectos independientes. En respuesta a esta pregunta, se ha observado que la administración subcrónica de olanzapina en la rata produce la elevación de la concentración plasmática de triglicéridos e incrementa la expresión de los genes lipogénicos controlados por SREBP-1 de forma independiente de la ganancia de peso producida (Skrede et al., 2013).

### 4.3. Efectos *in vitro* de los antipsicóticos

En la literatura científica existen pocos datos sobre el efecto de los antipsicóticos en la biosíntesis de lípidos. Summerly y Yardley fueron los primeros en demostrar, en 1965, que el haloperidol inhibía la biosíntesis de colesterol en fibroblastos de piel de rata (Summerly and Yardley, 1965). Nuestro grupo demostró que tanto en la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y como en la línea celular de promielocitos humanos HL-60, el haloperidol inhibe la biosíntesis de colesterol, provocando una disminución del contenido intracelular de colesterol y la acumulación de diferentes esteroides intermediarios (7DHC, zimostenol y colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol), sugiriendo que este antipsicótico inhibía la actividad de las enzimas  $\Delta^7$ -reductasa,  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y  $\Delta^{14}$ -reductasa, en orden decreciente (Sánchez-Wandelmer et al., 2009a; Sánchez-

Wandelmer et al., 2010). Kristiana y colaboradores, mediante la medición de la incorporación de acetato radiactivo al colesterol sintetizado *de novo*, confirmaron este efecto del haloperidol sobre la biosíntesis de colesterol; además, demostraron que los SGA, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona y ziprasidona, también tienen la capacidad de inhibir la biosíntesis de colesterol, aunque sin determinar las posibles reacciones afectadas (Kristiana et al., 2010). Por contra, Laouressergues y colaboradores mostraron que la clozapina y la olanzapina (Laouressergues et al., 2010) y la risperidona (Laouressergues et al., 2011) incrementaban, en vez de inhibir, la biosíntesis de colesterol en cultivos de hepatocitos primarios de rata, mientras otros antipsicóticos, como el haloperidol, quetiapina y aripiprazol no afectaban esta vía (Laouressergues et al., 2010). Estos resultados contradictorios podrían deberse a las diferencias metodológicas existentes entre los distintos estudios.

Nuestro grupo también demostró por primera vez, en células en cultivo, que el haloperidol afecta el tráfico intracelular de las LDL, impidiendo la salida del colesterol libre desde el compartimiento endocítico al RE, produciéndose una acumulación de colesterol libre en los endosomas tardíos/lisosomas (Sánchez-Wandelmer et al., 2010). Otros autores confirmaron este efecto del haloperidol y ampliaron el estudio a otros antipsicóticos, como la pimozida y la clozapina, demostrando que también estos provocan la acumulación intracelular del colesterol libre derivado de las LDL (Kristiana et al., 2010). La mayoría de los antipsicóticos son aminas anfipáticas, potencialmente protonables debido a los grupos aminos, presentando tanto propiedades hidrofílicas como hidrofóbicas (**Figura 4**) (Goldman et al., 2009). Es interesante que otras aminas anfipáticas, como el tamoxifeno (Kedjouar et al., 2004; Suárez et al., 2004) o el U18666A (**Figura 4**) (Lange et al., 1998), son inhibidores de ciertas enzimas que actúan en la parte final de la biosíntesis de colesterol (conversión de esteroides) y también afectan el tráfico intracelular de las LDL.

Varios grupos han demostrado que los antipsicóticos modifican la expresión de los SREBPs y de sus genes diana en líneas celulares humanas (Ferno et al., 2005; Ferno et al., 2006; Polymeropoulos et al., 2009). Así, la clozapina y el haloperidol incrementan la expresión de los genes que codifican para la HMG-CoA reductasa, HMG-CoA sintasa, FASN y SCD (Ferno et al., 2005). Sin embargo, no todos los antipsicóticos tienen el mismo efecto sobre la activación de los SREBP y de sus genes diana, existiendo grandes diferencias entre los distintos antipsicóticos (Ferno et al.,

2006; Polymeropoulos et al., 2009). La inhibición de la biosíntesis de colesterol y del tráfico de LDL suponen la alteración de la homeostasis intracelular de colesterol. Por lo tanto, los cambios en la expresión y activación de los SREBP y en sus genes diana probablemente no sean más que la respuesta celular dirigida a recuperar la homeostasis lipídica.

### 5. EXOSOMAS

En los organismos pluricelulares, las células se comunican a través de moléculas extracelulares como nucleótidos, lípidos o proteínas. Estas moléculas son liberadas por las células al medio extracelular, se unen a receptores de otras células, induciendo una señalización intracelular y modificando el estado fisiológico de la célula receptora. Además de estas moléculas, las células eucariotas son capaces de liberar vesículas rodeadas de membrana al medio extracelular. Las vesículas contienen numerosas proteínas y lípidos e incluso ácidos nucleicos, que pueden afectar a las células receptoras de una manera muy compleja. Los exosomas representan un tipo específico de vesículas rodeadas de membrana (Cocucci et al., 2009; Thery et al., 2009).

Los exosomas tienen un tamaño comprendido entre los 40 y los 100 nm de diámetro y una densidad de 1.13 – 1.19 g/ml en sacarosa (Thery et al., 2006). Están enriquecidos en proteínas derivadas de la membrana plasmática, de la vía endocítica y del citosol, aunque también pueden contener pequeñas cantidades de proteínas del Golgi, RE y el núcleo. Aun así, son claramente distintos a las vesículas liberadas por las células apoptóticas, en cuanto que estas últimas presentan un patrón de expresión de proteínas donde predominan las proteínas nucleares de unión al ADN como las histonas, y tienen una densidad mayor que los exosomas (Thery et al., 2001).

#### 5.1. Biogénesis de los exosomas

Los exosomas se originan a partir de vesículas intraluminales presentes en los MVB (Thery, 2011), sin embargo, los mecanismos implicados en la biogénesis de exosomas pueden variar dependiendo del tipo celular y de las condiciones en las que se encuentre la célula. En células dendríticas se ha demostrado la participación de los miembros de la maquinaria del complejo de clasificación endosomal requerida para el transporte (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*, ESCRT) (Thery et al., 2001;



Tamai et al., 2010). En los oligodendrocitos, sin embargo, no parece participar ECSRT pero sí las ceramidas (Trajkovic et al., 2008). Otro lípido que parece estar implicado en la formación de vesículas intraluminales en los MVB es el ácido lisobisfosfatídico (LBPA) (Matsuo et al., 2004). Estudios recientes indican que CD63, una proteína de la familia de las tetraspains presente de manera abundante en los MVB, es necesaria para la formación de las vesículas intraluminales (Thery, 2011).

### 5.2. Secreción de los exosomas

Una vez formados los MVB, estos deben fusionarse con la membrana plasmática para liberar su contenido y secretar los exosomas. Clásicamente, en el transporte intracelular y la fusión de vesículas participan proteínas de la familia Rab. Al igual que ocurría con la biogénesis, en la secreción también se han descrito diferentes moléculas que participan en el proceso, dependiendo del tipo celular. En la línea celular de eritroleucemia K562 se ha demostrado que Rab11 es necesaria para la salida de exosomas inducida por calcio (Savina et al., 2005). En oligodendrocitos, Rab35 juega un papel importante en la secreción de exosomas (Hsu et al., 2010). Rab27a y Rab27b controlan de forma complementaria diversos pasos de la vía de secreción de exosomas en células HeLa (Ostrowski et al., 2010). El paso final de la fusión entre los MVB y la membrana plasmática probablemente está mediado por proteínas SNARE (*Soluble NSF Attachment Receptor*), aunque todavía no se conoce la maquinaria celular implicada. La producción y secreción de exosomas es una función celular rutinaria, y puede verse incrementada por distintos factores como, el estrés por radicales libres, la radiación UV, el descenso de la cantidad de colesterol en las membranas o el incremento del calcio citosólico (Pant et al., 2012).

### 5.3. Función de los exosomas

La primera función que se le atribuyó a los exosomas derivados de células cultivadas en monocapa, fue la de transportar las ecto-enzimas de la membrana de las que la célula quería desprenderse (Trams et al., 1981). Más tarde esta función de los exosomas fue ampliada y se propuso que los exosomas son sumideros de proteínas obsoletas y de membrana sobrante (Pant et al., 2012). Hoy en día, a parte de ser considerados como vehículos de distintos tipos de moléculas, se conoce que los exosomas pueden ser

captados por células receptoras a través de un mecanismo específico y no al azar (Rana and Zoller, 2011), y que el vertido del contenido de los exosomas produce una respuesta en la célula hospedadora comparable a la desencadenada por los sistemas clásicos de señalización celular (Pant et al., 2012) por lo que se les puede considerar reguladores de la comunicación célula-célula.

Los exosomas están presentes en la mayoría de los fluidos corporales como el plasma, la orina, la saliva, el lavado bronqueoalveolar y el fluido cerebroespinal (Caby et al., 2005; Simpson et al., 2009) y están implicados en numerosos procesos, tanto fisiológicos como fisiopatológicos (Corrado et al., 2013). Así, tienen actividad inmunomoduladora, con efectos inmunosupresores e inmunoactivadores (Pant et al., 2012). Participan en la supervivencia y metástasis de tumores mediante la modificación del microambiente (Pant et al., 2012). Se ha descrito el papel de los exosomas en la comunicación entre neuronas en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y neurodegeneración inducida por Priones (Fevrier et al., 2004; Aguzzi and Rajendran, 2009). También se han referido varios procesos de enfermedad cardiovascular, como la arterioesclerosis (Hergenreider et al., 2012), hiperplasia del corazón o disfunción de los miocardiocitos (Azevedo et al., 2007) en los que los exosomas juegan un papel importante en su desarrollo.

Las células hepáticas se ha comprobado que actúan como células secretoras y como receptoras de exosomas. A pesar de los limitados estudios realizados en el hígado, los datos parecen indicar que estas vesículas son importantes en la fisiología y fisiopatología del hígado (Masyuk et al., 2013). Así, se han relacionado con la patogénesis del carcinoma hepatocelular (Kogure et al., 2011), la hepatitis vírica (Tamai et al., 2012) y la inflamación hepática (Deng et al., 2009). Por otra parte, los exosomas aislados de hepatocitos de ratón contienen enzimas de la familia del citocromo P450 por lo que podrían estar implicados en la detoxificación de fármacos (Conde-Vancells et al., 2008).

*Objetivos*

---



## **OBJETIVOS**

La finalidad del presente trabajo ha sido estudiar en modelos celulares los efectos de los antipsicóticos sobre la homeostasis intracelular del colesterol, como exponente de los efectos secundarios que producen dichos fármacos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar los efectos de los antipsicóticos de segunda generación sobre la biosíntesis de colesterol y la composición en esteroides, en líneas celulares.
2. Estudiar los efectos de los antipsicóticos de segunda generación sobre la vía endocítica de utilización de LDL.
3. Determinar los cambios en la expresión génica promovidos por la inhibición de la biosíntesis y del tráfico intracelular del colesterol por efecto de los antipsicóticos de segunda generación.
4. Analizar los efectos de los antipsicóticos de segunda generación sobre la biosíntesis de lípidos saponificables y la secreción de apoB en hepatocitos.
5. Estudiar la posibilidad de aliviar el depósito lipídico inducido por los antipsicóticos, mediante el tratamiento con curcumina, un polifenol con capacidad de estimular la secreción de colesterol al medio extracelular.



## *Material y Métodos*

---





## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los reactivos empleados fueron de calidad para análisis o HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) según el caso.

### **1. ANTIPSICÓTICOS**

Los antipsicóticos usados en este estudio fueron clozapina, haloperidol, risperidona y ziprasidona, todos ellos de Sigma-Aldrich. También usamos un clásico inhibidor de tráfico intracelular, el U18666A (Tocris). Los compuestos fueron disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido), de manera que la concentración final del solvente en el medio de cultivo fuera del 0.044%.

### **2. LÍNEAS Y CULTIVOS CELULARES**

#### **2.1. Células HepG2**

La línea celular de hepatoma HepG2 (ATCC HB-8065) fue elegida debido a su intenso metabolismo lipídico, además de la participación activa del hígado en el metabolismo de los antipsicóticos en el organismo. Estas células se mantuvieron en *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) con alta concentración en glucosa (Lab-Clinics) suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco), 10 µg/ml de gentamicina (Gibco) y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **2.2. Células SH-SY5Y**

La línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) fue seleccionada al ser las neuronas son la principal diana de los antipsicóticos desde el punto de vista terapéutico. Las células se incubaron en medio RPMI 1640 (RPMI) (Lab-Clinics), suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 10 µg/ml de gentamicina y 2 mM de L-Glutamina (Gibco), en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **2.3. Células HL-60**

La línea celular de promielocitos humanos HL-60 (ECACC 98070106) es muy útil para el estudio de la biosíntesis de colesterol dado que normalmente es muy activa, debido al alto requerimiento de este lípido para mantener la proliferación celular. Fueron cultivadas en medio libre de colesterol ITS+, con la siguiente composición: RPMI, suplementado con 625 µg/ml de transferrina (Roche), 625 µg/ml de insulina, 535 µg/ml de ácido linoléico acomplejado con albúmina de suero bovino (BSA), 625 ng/ml de selenito de sodio, 125 µg/ml de albúmina de suero humano (Grifols), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, y 10 µg/ml de gentamicina. Las células se cultivaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **2.4. Células THP-1**

La línea de monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) se utilizó por la relevancia y peculiaridades de la homeostasis del colesterol de los monocitos/macrófagos. Las células se incubaron en medio RPMI, suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 10 µg/ml de gentamicina y 2 mM de L-Glutamina, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Para diferenciar las THP-1 a macrófagos, se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  cel/ml en su medio de cultivo y se trataron con  $1.6 \times 10^{-7}$  M PMA (*phorbol myristate acetate*) durante 72 h, entonces el medio es reemplazado por un medio nuevo durante 48-72 h, tras lo cual las células adoptan el fenotipo de macrófagos (Daigneault et al., 2010).

## **3. OBTENCIÓN DE LIPOPROTEÍNAS (LDL Y DiI-LDL) Y SUERO DEFICIENTE EN LIPOPROTEÍNAS**

Las LDL (densidad 1.019-1.063 kg/l) se aislaron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad (Brown and Goldstein, 1974) a partir de dializados de pacientes con hipercolesterolemia sometidos a aféresis de LDL en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Las DiI-LDL se elaboraron a partir de LDL humanas mediante marcaje con la sonda fluorescente DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3,3'-tetrametil-in-docarbocianinaperclorato) (Life

Technologies Corporation) según el método descrito por Calvo y colaboradores (Calvo et al., 1998).

El suero deficiente en lipoproteínas (LPDS) se obtuvo mediante ultracentrifugación de FBS a densidad 1.24 kg/l durante 40 h. Antes de su utilización, las LDL y el LPDS se dializaron exhaustivamente frente a NaCl 0.15M (pH 7.4) y se esterilizaron con filtros de 0.22 µm.

#### **4. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ESTEROLES**

Para el análisis de la síntesis y del contenido de esteroides se siguió el método de Fernández y colaboradores (Fernández et al., 2002). Se incubaron 10<sup>6</sup> células HepG2 o HL-60 en medio con 10% de LPDS o en medio libre de colesterol ITS+, respectivamente, y con los distintos antipsicóticos a distintas concentraciones. Después de 2 h de preincubación en esas condiciones, se añadieron al medio 40 µCi de [<sup>14</sup>C]-acetato (58 mCi/mmol) (Amersham-GE Healthcare) prolongándose la incubación durante 8 h más.

En los experimentos dirigidos a analizar la respuesta de las células tras la retirada de los antipsicóticos, del medio (periodo de lavado), las células HepG2 se incubaban en medio con 10% de LPDS en ausencia (control) o en presencia de los distintos antipsicóticos durante 16 h, entonces se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Se añadió medio fresco sin los antipsicóticos, suplementado con 40 µCi de <sup>14</sup>C-acetato y se incuban las células 8 h más y se procesaron para su análisis por HPLC. Para ello, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron finalmente en 500 µl de KOH (10%) para lisarlas. Luego se extrajeron los lípidos con cloroformo/metanol (2:1) y, a partir de este extracto, se separaron los lípidos no saponificables tras saponificación con potasa etanólica y extracción con hexano (Folch et al., 1957). Esta última fracción se inyectó en el equipo de HPLC. El porcentaje de recuperación total del proceso se determinó en cada caso con un estándar interno y fue siempre superior al 60%.

La separación cromatográfica se realizó con una columna de fase reversa Luna 5µm C18 (250 x 4,60 mm, Phenomenex) para las muestras de HepG2 y una columna Mediterranea SEA 18.5 µm C18 (250 x 4.60 mm, Teknokroma) para las HL-60. Los lípidos se eluyeron con acetonitrilo-agua (95:5, v/v) para las HepG2 y con acetonitrilo-

agua (95:3.5, v/v) para las HL-60 durante los primeros 37 min y a continuación se prosiguió la elución con metanol absoluto a un flujo de 1.2 ml/min. El efluente fue monitorizado simultáneamente por ultravioleta (UV) (detector de diodos Beckman 168; Beckman Instruments) y radioactividad (LB-506 C-1, Berthold). La identificación de los esteroides se realizó por comparación con los tiempos de retención de estándares puros y por análisis del espectro UV. El método de HPLC no puede resolver entre zimostenol y colesterol ni entre zimosterol y desmosterol.

### **5. ANÁLISIS DE ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)**

Los esteroides se extrajeron como hemos explicado en el apartado anterior y se disolvieron en tert-butilmetileter; posteriormente se derivatizaron utilizando N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida/trimetilsililimidazol (9:1). A continuación se separaron y analizaron utilizando el equipo Agilent 6890N GC acoplado al detector Agilent 5975 MS (Agilent Technologies) y una columna DB-5ms, 30 m x 0.25 mm, con un grosor de 0.1  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies). Como fase móvil se utilizó helio, a un flujo de 1 ml/min. El portal de inyección se mantuvo a 260°C. La temperatura del horno al principio se fijó a 55°C, durante dos min, y se fue incrementando hasta 260°C con un ratio de 55°C/min. A esa temperatura se mantuvo 10 min y se volvió a elevar hasta 310°C con un ratio de 7°C/min. Para la cuantificación se utilizó un detector que monitorizaba tanto en modo de barrido completo como en modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) analizando los iones característicos de cada esteroide. Como estándar interno se utilizó 5 $\alpha$ -colestano. La cuantificación directa se realizó por comparación directa frente a patrones según correspondiera.

### **6. SÍNTESIS DE LÍPIDOS**

Las células HepG2 se incubaron en ausencia (control) o presencia de los distintos antipsicóticos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 20 h. Transcurrido ese tiempo, se añadió al medio 2  $\mu\text{Ci}$  de [2-<sup>14</sup>C]-acetato (58 mCi/mmol) (Amersham-GE Healthcare) por cada ml, prolongándose la incubación durante 4 h. En otros experimentos, las células fueron incubadas en presencia de los antipsicóticos o en condiciones control,

durante 20 h, luego las células se lavaron dos veces con PBS, y se incubaron otras 4 h con [2-<sup>14</sup>C]-acetato en ausencia de los antipsicóticos.

En todos los casos, al final de la incubación se lavaron las células dos veces con PBS, se recogieron y se extrajeron directamente mediante el método de Folch (Folch et al., 1957). Los grupos mayoritarios de lípidos se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC), usando placas de Silica Gel F254 (Merck, EMD Millipore Corporation) y una fase móvil compuesta de hexano:dietil éter:ácido acético glacial (90:30:1, v:v:v). Los lípidos se visualizaron mediante tinción con vapores de yodo, comparándolos con patrones. Las bandas correspondientes a fosfolípidos, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de colesterol, fueron recortadas y puestas en tubos con líquido de centelleo para el conteo de su radiactividad (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer).

### **7. SALIDA DE COLESTEROL AL MEDIO EXTRACELULAR**

En primer lugar procedimos al marcaje de las LDL con [<sup>3</sup>H]-colesterol (Perkin-Elmer) para lo cual seguimos lo previamente descrito con pequeñas modificaciones (Xu et al., 1992). A 2 ml de LDL a una concentración de 5 mg de colesterol/ml en ClNa 0.9% se le añade 200 µCi de [<sup>3</sup>H]-colesterol previamente secado bajo corriente de N<sub>2</sub> y la mezcla se incubó a 4°C durante 5-7 h con agitación muy suave ocasional.

Para los experimentos, se sembraron HepG2 (5x10<sup>5</sup> células por condición) en medio con FBS 10% y se incubaron durante 24 h en esas condiciones. Pasado ese tiempo, se cambió el medio por otro con LPDS al 10%, y se trataron con los distintos antipsicóticos (10 µM) y 60 µg de colesterol/ml de LDL marcadas con [<sup>3</sup>H]-colesterol, durante 22 h. Tras el tratamiento, se lavaron las células con PBS dos veces, se añadió medio sin suero así como los correspondientes antipsicóticos y se incubaron otras 2 h en ausencia (control) o en presencia de curcumina 30 µM. Transcurrido ese tiempo, se recogió el medio y se midió la radiactividad presente. Por otro lado, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con NaOH 0.1 M. El lisado se neutralizó con HCl 0.1 M y se midió la radiactividad con ayuda del contador de centelleo líquido. La salida de [<sup>3</sup>H]-colesterol se calculó como el tanto por ciento de [<sup>3</sup>H]-colesterol en el medio respecto al total (células + medio).

## **8. CUANTIFICACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE DiI-LDL POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Este análisis se realizó según lo descrito (Suárez et al., 2004). Se sembraron  $5 \times 10^5$  células HepG2 por cada condición; tras 24 h en medio con FBS al 10%, se puso medio con LPDS al 10% más 30  $\mu\text{g}$  colesterol/ml de DiI-LDL, y se trataron o no (control) las células con los distintos antipsicóticos a 10  $\mu\text{M}$  durante 22 h. Para determinar la captación inespecífica preparamos una réplica del experimento al cual se le trató igual pero se le añadió 50 veces más de LDL sin marcar. Las células fueron analizadas usando un citómetro de flujo (FACSscan, BD Bioscience). Los resultados se expresaron como mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) específica, que se obtuvo al restar la fluorescencia inespecífica de la autofluorescencia a la total. Para determinar la autofluorescencia se analizaron células no tratadas con DiI-LDL.

## **9. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS**

La concentración de proteínas se determinó mediante ácido bicinconínico con el kit *BCA Protein Assay* (Pierce).

## **10. DETECCIÓN DE APOB EN EL MEDIO EXTRACELULAR Y EN LISADOS CELULARES**

Se siguió el método publicado por Meex y colaboradores (Meex et al., 2011). Las HepG2 se sembraron a razón  $1 \times 10^6$  células por condición. Las células se trataron con los antipsicóticos (10  $\mu\text{M}$ ) durante 20 h o se dejaron sin tratar (control), luego se retiró el medio y se reemplazó por uno libre de metionina y cisteína (Invitrogen, Cat #21013-024) con 5% FBS y 1% de glutamina, durante 1 h. A continuación se añadió  $\sim 50 \mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -metionina (Hartmann Analytic) a cada condición durante 15 min, como trazador de la síntesis de proteínas (Meex et al., 2011). Tras este pulso, se retiró el medio, se lavaron dos veces las células con PBS y se añadió medio fresco con metionina fría (1.5 mg/ml) (Sigma) y 5% FBS y se dejó incubando durante 3 h. Transcurrido ese tiempo se recogió por un lado el medio de cultivo y por otro las células, que se lisaron según se describe más adelante.

El medio se recogió en tubos que contenían 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Por su parte, las células se lavaron dos veces con PBS y se les

añadió tampón de lisis (10 mM PBS [pH 7.4], 125 mM NaCl, 36 mM dodecil sulfato de litio, 24 mM desoxicolato y 1% Tritón X-100) suplementado con inhibidores de proteasas (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free, Thermo Scientific) y 1 mM PMSF. Se pusieron las muestras en agitación durante 30 min para favorecer la lisis, después se recogieron los lisados en tubos y se calentaron a 95° C durante 30 min. Tras lo cual, se dejaron en hielo 5 min, se agitaron bien las muestras y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min quedándonos con el sobrenadante. Para la inmunoprecipitación de <sup>35</sup>S-apoB-100, el medio de cultivo y el lisado celular se mezclaron, por separado, con tampón NET (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100 y 0.1% SDS), inhibidor de proteasas, 5 µl del anticuerpo primario (anti-apoB o anti-albumina) (**Tabla 2**) y proteína A Sefarosa (Sigma) preparada al 10% en PBS. Los tubos se dejaron toda la noche a 4°C en una noria. A la mañana siguiente se centrifugaron los tubos a 7500 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de tampón NET, esto se repitió dos veces más. Tras el último lavado se retiró todo el sobrenadante y se añadieron 30 µl de tampón de carga, se calentaron las muestras a 95°C 6 min y se dejaron en hielo 5 min, para separar el complejo antígeno-anticuerpo de la Proteína A. Tras centrifugar, el sobrenadante se utilizó para realizar una electroforesis SDS-PAGE usando geles *Mini protean TGX 4-15%* (Bio-Rad, ref 4561083). Tras la electroforesis, los geles se fijan 1 h en metanol al 40% en acético al 10%, se lavan con etanol al 30% y se secan. A continuación se expusieron a una placa *Kodak Storage Phospho Screen* (Amersham Biosciences), que fue finalmente leída con el equipo Typhoon 9400 PhosphorImager para cuantificar la radioactividad.

Para calcular la cantidad total de proteína sintetizada y poder igualar las muestras, se disponen por triplicado 20 µl de muestra (medio o lisado) en pequeños cuadrados de papel Whatman. Se incuban en TCA (ácido tricloracético) al 10% durante 15 min a 4°C. Después se lavan dos veces con TCA al 5% y se calientan en TCA 5% hasta casi hervir. Después se lavan dos veces con etanol al 95% y se dejan secar. Por último, se cuantifica la radioactividad mediante un contador de centelleo líquido.

Los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación de las proteínas en el medio extracelular y en el lisado celular fueron el anticuerpo frente a apoB (Calbiochem, 178467) y un anticuerpo frente a la albúmina (Aviva Systems Biology, OAMA02965) (**Tabla 2**). Para favorecer la degradación intracelular de la apoB usamos CP-346086

(Sigma) a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , como inhibidor de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), que favorece la degradación de la apoB al impedir que se cargue de lípidos.

### **11. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE EXOSOMAS**

Las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^6$  en medio de cultivo, al día siguiente se pusieron en medio con LPDS y LDL (60  $\mu\text{g}$  de colesterol/ml), en ausencia (control) o presencia de los distintos antipsicóticos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 22 h. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células dos veces con PBS, se les puso medio sin suero, y se trataron nuevamente con los antipsicóticos a 10  $\mu\text{M}$ , y a determinados pocillos se les añadió curcumina 30  $\mu\text{M}$ , dejándose incubar durante 2 h. Una vez terminada la incubación, se recogió el medio y se centrifugó a 800xg 10 min para sedimentar las células, el sobrenadante se volvió a centrifugar dos veces a 12,000xg 30 min para eliminar residuos, por último los exosomas fueron sedimentados a 100,000xg durante 2 h (They et al., 2006) y se resuspendieron en PBS.

Por otro lado, las células se recolectaron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Para lissarlas, se añadió 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM [pH 7.5], NaCl 125 mM, NaF 5 mM, NaP pyro 1.4 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM, EDTA 1 mM, Nonidet P40 1% e inhibidores de proteasas) durante 30 min. Tras lo cual, se centrifugaron a 10,000xg 10 min, recogiendo el lisado celular en el sobrenadante.

#### **11.1. Análisis de la actividad de la $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa**

La cantidad de exosomas liberados por las células al medio, se cuantificó midiendo la actividad de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $\beta$ -hexosaminidasa), una enzima lisosomal. Para ello se utilizó el kit comercial (Sigma-Aldrich, CS0780-1KT), que se basa en la hidrólisis del sustrato 4-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa, liberando p-nitrofenol que tras su ionización a pH básico puede medirse a 405 nm. También se midió la actividad enzimática en el lisado celular, para calcular la actividad enzimática total. La cantidad de enzima liberada al medio se expresó como porcentaje del total.



### **11.2. Análisis de exosomas mediante citometría de flujo**

Las células HepG2 se incubaron con los distintos antipsicóticos en presencia de DiI-LDL (60 µg de colesterol/ml), posteriormente se trataron o no con curcumina según lo descrito anteriormente. Los exosomas se aislaron como se comenta en el Apartado 11, tras lo cual, se adsorbieron a microesferas de látex de sulfato de aldehído de 4 µm (*aldehyde-sulfate latex beads*; Life Technologies Corporation) y se analizaron por citometría de flujo. Para ello se toman  $1.5 \times 10^6$  microesferas de látex por condición y se lavan dos veces con MES 0.025M (pH 6), para la cual se centrifugan a 12,000xg 10 min. A continuación se incuban los exosomas y las microesferas de látex durante 1 h a temperatura ambiente y después toda la noche a 4 °C con agitación suave. Entonces se centrifugan a 12,000xg 10 min, se retira el sobrenadante, y se resuspende la muestra en glicina 100 mM en PBS, incubándose a temperatura ambiente 45-60 min para bloquear las uniones de las microesferas de látex no ocupadas por los exosomas. Las muestras se centrifugan a 12,000xg 10 min y se resuspenden en 1% de suero normal de cabra (NGS) en PBS, incubándose 15 min a temperatura ambiente; se centrifuga y se añade el anticuerpo primario CD63 (**Tabla 2**) a una dilución 1/200 en 1% NGS en PBS incubándose 2 h a temperatura ambiente. Se lavan las muestras y por último se añade el anticuerpo secundario acoplado a FITC (fluoresceína isotiocianato) (BD Bioscience) diluido 1/500 en 1% NGS en PBS, incubándose 30 min a 37°C y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se analizan mediante el citómetro de flujo (FACScan, BD Bioscience).

### **11.3. Análisis de exosomas por microscopía electrónica**

Este análisis se realizó en colaboración con la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma de Madrid. Los exosomas aislados se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 2% y se montaron en rejillas de carbón recubiertas del polímero *formvar*. Después se realizó una post-fijación en glutaraldehído al 1%. Tras los lavados, las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y se embebieron en una mezcla de acetato de uranilo al 0.8% y metilcelulosa al 2%. Las rejillas fueron examinadas usando un microscopio electrónico JEOL JEM1010 (JEOL ltd.).

<b>Nombre del Anticuerpo (Anti-)</b>	<b>Casa Comercial (referencia)</b>	<b>Aplicación</b>
Actina	Santa Cruz (sc-1616)	WB
Albúmina	Aviva Systems Biology (OAMA02965)	IP
ApoB	Calbiochem (178467)	IP
CD63	Santa Cruz (sc-15363)	WB
CD63	BD Biosciences (556019)	ICC, FC
$\beta$ COP	Affinity Bioreagents (PA1-061)	ICC
EEA1	BD Biosciences (610456)	ICC
Flotilina-2	BD Biosciences (610383)	WB
LAMP2	Abcam (ab25631)	ICC
LBPA	Echelon Biosciences (Z-SLBPA)	ICC
LISENINA	PeptaNova	ICC

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para western-blot (WB), inmunoprecipitación (IP), inmunocitoquímica (ICC) y citometría de flujo (FC).

## **12. INMUNODETECCIÓN POR WESTERN-BLOT**

Para la inmunodetección de las proteínas de interés se utilizaron 20-50  $\mu$ g de proteína celular o los exosomas aislados. Las muestras se solubilizaron en tampón de carga 5X (Tris-HCl 321.5 mM [pH 6.8], glicerol 50%, SDS 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol 25%), y se calentaron a 100°C durante 5 min. Las proteínas se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en geles de 8-10% de poliacrilamida. Después, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia húmeda, a 100V durante una hora o a 15V durante toda la noche, en ambos casos a 4°C. La unión de los anticuerpos primarios a proteínas inespecíficas se bloqueó con caseína al 0.1% en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4). A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos según la proteína de interés (**Tabla 2**), disueltos en TBS-Tween 20 0.1 % toda la noche a 4°C, o 2 h a temperatura ambiente. Tras lo cual, las membranas

se lavaron con TBS-Tween 20 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con IRDye 800CW o IRDye 680LT (LI-COR), en dilución 1:4,000-1:6,000, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron con TBS-Tween 20 0.1%, y para la visualización se utilizó el equipo *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR).

### **13. INMUNOCITOQUÍMICA**

#### **13.1. Inmunocitoquímica y microscopía confocal**

Las células HepG2 y THP-1 diferenciadas se sembraron a  $3 \times 10^4$  células por condición en cubres de cristal tratados con poli-D-lisina y se incubaron 24 h en medio completo, tras lo cual se pasaron a un medio con 10% LPDS y se trataron con los distintos antipsicóticos durante 20-24 h, o bien sin ellos (control). Al final de la incubación, se fijaron las células con PFA al 4% durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS, y se tiñeron durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad, con filipina (Sigma) (50  $\mu\text{g/ml}$ ) en PBS. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante al menos 45 min. A continuación, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios específicos para las distintas proteínas (**Tabla 2**), disueltos en BSA al 2%. Los anticuerpos primarios se lavaron 3 veces con PBS y las células se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados en cada caso (1/500), acoplados a Alexa 488 ó 568 (Life Technology Corporation) durante 40-45 min y se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, se montaron en los portaobjetos en medio de montaje *ProLong Gold antifade reagent* (Life Technology Corporation). Las células se observaron y se tomaron fotos de ellas, usando un microscopio confocal Nikon D Eclipse C1.

#### **13.2. Tinción de esfingomielina**

Las células se fijaron, permeabilizaron y bloquearon como se indica en el Apartado 13.1. A continuación, se incubaron con Lisenina 1  $\mu\text{g/ml}$  (PeptaNova) en 2% BSA en PBS durante 2 h, después se lavaron 3 veces con PBS. Entonces se incubaron con el anticuerpo contra lisenina (1/200) en 2% BSA en PBS durante 1 h y se lavaron 3 veces

con PBS. Por último, se incubaron con el anticuerpo secundario para conejo conjugado con Alexa 568 (1/500) 45 min y se montaron como se ha descrito anteriormente para su observación al microscopio.

### **13.3. Tinción con DQ-BSA**

Utilizamos THP-1 diferenciadas que sembramos y tratamos como se explica en el Apartado 13.1, durante las últimas 4 h se suplementó el medio de cultivo con DQ-BSA (Life Technology, D12050) a una concentración final de 1 µg/ml. El DQ-BSA es un sustrato para las proteasas, el cual es captado por la célula a través de los receptores Fc, y produce fluorescencia al ser hidrolizado. Una vez terminado el tratamiento las células se fijaron, permeabilizaron y bloquearon como se indica en el Apartado 13.1. Posteriormente se tiñeron con filipina y se montaron como se indica en los apartados anteriores, para su análisis mediante microscopía confocal.

## **14. EXTRACCIÓN DE ARN, RETROTRANSCRIPCIÓN Y PCR EN TIEMPO REAL**

### **14.1. Extracción de ARN**

Las células HepG2 se trataron con los antipsicóticos a distintas dosis y tiempos y se homogeneizaron con TRI REAGENT™ (Sigma) en una proporción de 1 ml por cada  $10^6$  células. Para la extracción de ARN, se añadió cloroformo en la proporción de 200 µL por cada 1 mL de TRI REAGENT™. Se mezclaron bien utilizando el agitator y se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12,000xg durante 10 min a 4°C y se extrajo la fase superior acuosa a la que se le añadió isopropanol 0,5 mL por cada 1 mL de TRI REAGENT™, se agitaron con el agitator y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugaron a 12,000xg durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en etanol al 75% y se centrifugó durante 5 min en las mismas condiciones anteriores; se descartó el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado y las muestras se dejaron secar para posteriormente ser resuspendidas en agua DEPC precalentada a 65°C. Finalmente, las muestras se incubaron a 65°C durante 15 min para disolver el precipitado y se midió su absorbancia a 260/280 nm en un

espectrofotómetro NanoDrop para conocer la concentración de ARN, y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

### **14.2. Retrotranscripción (RT)**

Para la RT se utilizó el kit de Takara Bio Inc. a partir de 500 ng de ARN en un volumen final de 10  $\mu$ L y las siguientes concentraciones de reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración Final</b>
5X Primerscript™ Buffer	2	1X
PrimerScript™RT Enzyme MixI	0.5	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0.5	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5	50 pmol
ARN total (500 ng)		
Agua libre de RNAsas	Hasta 10	

La mezcla de reacción se incubó bajo las siguientes condiciones: 37°C, 15 min (transcripción reversa); 85°C, 5 segundos (inactivación de la transcriptasa inversa) y, finalmente, se mantuvieron a 4°C.

### **14.3. PCR en tiempo real**

A continuación, se llevó a cabo la PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler® 480 SYBER Green I Master (Roche) y el termociclador LightCycler® 2.0 (Roche). Para ello se utilizó una dilución 1/10 del ADNc retrotranscrito. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

## Materiales y Métodos

	Temperatura (°C)	Tiempo	Tasa de rampa (°C/s)
PRE-INCUBACIÓN	95	5 min	4.4
	95	10 s	4.4
INCUBACIÓN	60	15 s	2.2
	72	15 s	4.4
	95	5 s	4.4
CURVA DE MELTING	65	1 min	2.2
(curvas de disociación)	97	---	0.11
			(adquisición 5 por °C)
ENFRIAMIENTO	40	10 s	1.5

Se valoraron las curvas de *melting* (temperatura de fusión) de cada uno de los genes y los productos de la reacción de PCR se separaron en un gel de agarosa 2% para confirmar la presencia de un solo producto. La eficiencia de la reacción fue evaluada mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADNc (1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000). Nos aseguramos de que la relación entre las Ct (*cycle treshold*, o punto de cruce) y el log [ARN] era lineal ( $-3.6 < \text{pendiente} < 3.2$ ). Las muestras se analizaron por triplicado, y la cantidad relativa de los genes diana se normalizó con la expresión de un gen de referencia o *housekeeping*: RPLP0 que codifica para una proteína ácida de la subunidad 60S del ribosoma. Los resultados se analizaron con la plataforma informática del termociclador (LightCycler® 480 *software*, versión 1.5).

Los *primers* (cebadores) utilizados fueron los siguientes:

<b>Gen</b>	<b>Gene Bank ID</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5' &gt; 3'</b>
<i>ABCA1</i>	NM_005502.3	ABCA1 Fw	GCACTGAGGAAGATGCTGAAA
		ABCA1 Rev	AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTCA
<i>FASN</i>	NM_004104.4	FASN Fw	TACGTACTGGCCTACACCCAGA
		FASN rev	TGAACTGCTGCACGAAGAAGCATAT
<i>HMGR</i>	BC033692	HMGR Fw	GGACCCCTTTGCTTAGATGAAA
		HMGR Rev	CCACCAAGACCTATTGCTCTG
<i>LDLR</i>	NG_009060	LDLR Fw	GCGAAGATGCGAAGATATCGATG
		LDLR Rev	CCGGTTGGTGAAGAAGAGGTAG
<i>RPLP0</i>	BC000087	RPLP0 Fw	CCTCATATCCGGGGGAATGTG
		RPLP0 Rev	GCAGCAGCTGGCACCTTATTG
<i>SREBF1</i>	NM_004176.4	SREBF1 Fw	GCAAGGCCATCGACTACATTC
		SREBF1 Rev	GACAGCAGTGCGCAGACTTA
<i>SREBF2</i>	NM_004599	SREBF2 Fw	CTCACCTTCCTGTGCCTCTC
		SREBF2 Rev	AGGCATCATCCAGTCAAACC

**Tabla 3.** Secuencia de los *primers* utilizados en las reacciones de q-PCR.

## 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se muestran como la media  $\pm$  EE. Los análisis estadísticos se realizaron usando test ANOVA de una vía o de dos vías, según lo necesario y posterior análisis para comparar los diferentes grupos o condiciones entre sí. La diferencia entre dos valores se consideró significativa cuando el p-valor fue  $<0.05$ .





*Resultados*

---



## RESULTADOS

### 1. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL

#### 1.1. Estudio del efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis de colesterol en células HepG2

Nuestro grupo ya había descrito la inhibición de la colesterogénesis por parte del haloperidol (un antipsicótico típico o de FGA) en las líneas humanas HL-60 (promielocitos) y SH-SY5Y (neuroblastoma). En ambos tipos celulares, el haloperidol inhibe las reacciones catalizadas por la  $\Delta^7$ -reductasa, la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la  $\Delta^{14}$ -reductasa (Sánchez-Wandelmer et al., 2009b; Sánchez-Wandelmer et al., 2010). En el presente trabajo quisimos determinar si los antipsicóticos de segunda generación (SGA) también inhibían la colesterogénesis.

Para llevar a cabo este estudio, primeramente utilizamos las células de hepatoma humano HepG2 debido a que poseen un intenso metabolismo lipídico y porque el hígado tiene una participación activa en el metabolismo de estos fármacos en el organismo. Se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento, que se incubaron durante 10 horas en medio con LPDS en ausencia (células control) o en presencia de los distintos antipsicóticos (clozapina, risperidona y ziprasidona, y haloperidol para comparación) a las concentraciones de 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ . A las 2 horas de iniciar el tratamiento, se añadió al medio [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato y se incubaron las células durante 8 horas más. La radioactividad incorporada a las distintas especies de esteroides sintetizados, así como la naturaleza de los mismos se analizó mediante HPLC en fase reversa.

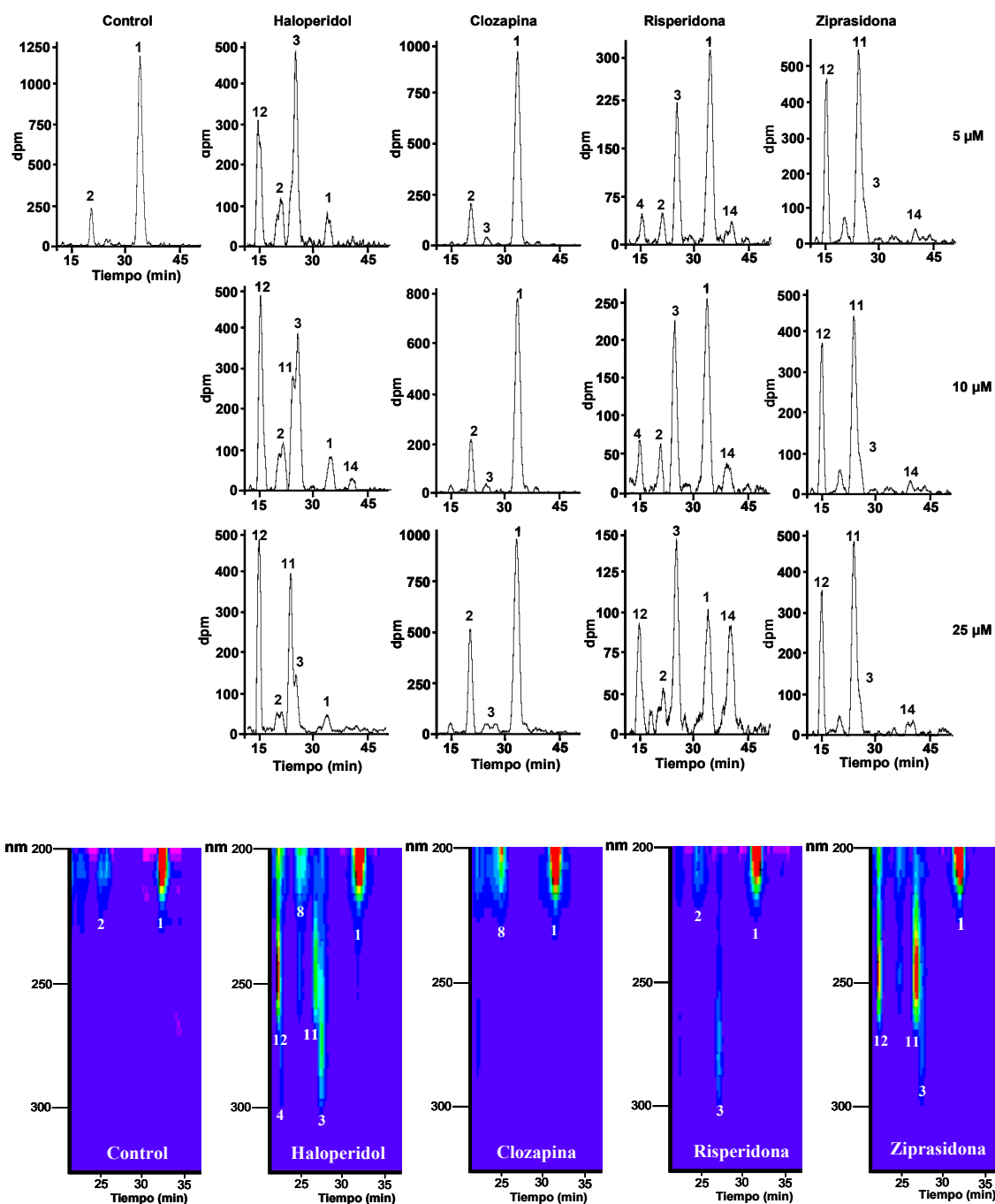
En las células incubadas en la condición control, la radioactividad apareció principalmente en forma de colesterol (pico 1) y también desmosterol (pico 2) (**Figura 5**). Como esperábamos, el tratamiento con haloperidol, redujo la incorporación de radioactividad al colesterol (a menos del 10% del control, ya con la menor dosis utilizada) e incrementó la incorporación de radioactividad a distintos precursores del colesterol como el 7DHC (pico 3), zimosterol (pico 8), colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11) y colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (pico 12). La magnitud de estos efectos era dependiente de la dosis (**Figura 5**). Estos resultados confirman que, también en las

células HepG2 el haloperidol inhibe las reacciones de la biosíntesis de colesterol catalizadas por la  $\Delta^7$ -reductasa, la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la  $\Delta^{14}$ -reductasa, en orden decreciente de actividad (Sánchez-Wandelmer et al., 2009b; Sánchez-Wandelmer et al., 2010).

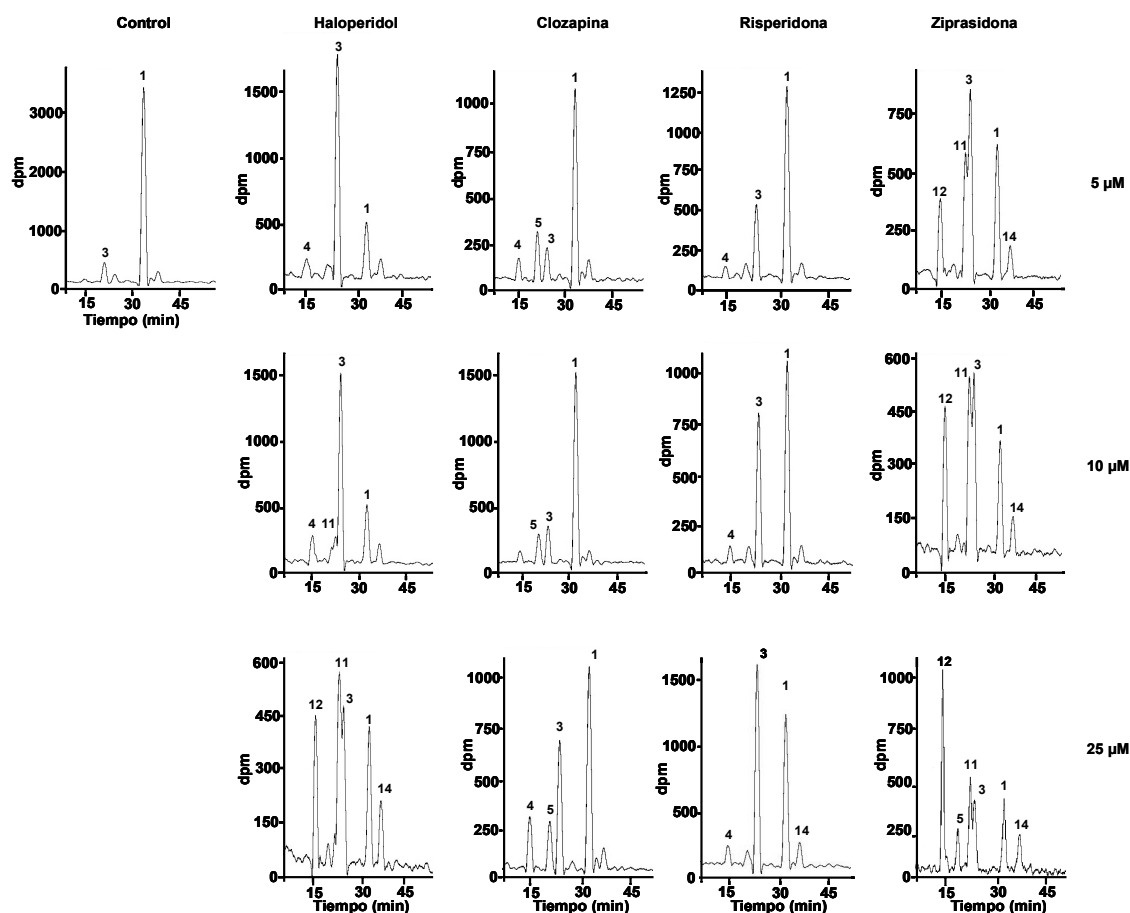
El tratamiento con clozapina resultó en un pequeño descenso en la incorporación de radioactividad al colesterol (un 15% menos que la del control con cualquiera de las dosis) y un incremento en la incorporación de radioactividad en desmosterol/zimosterol (pico 2/8), lo que indica una inhibición de la  $\Delta^{24}$ -reductasa y/o de la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa (**Figura 5**). Por su parte, el tratamiento con la risperidona supuso una reducción de la incorporación de radioactividad al colesterol (65-95% con respecto al control, según la dosis) y el incremento en 7DHC (pico 3) de manera dependiente de la dosis. A la mayor concentración de risperidona, también se incrementó la radioactividad en lanosterol (pico 14) y colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 12). Estos resultados sugieren una inhibición de las reacciones catalizadas por la  $\Delta^7$ -reductasa,  $\Delta^{14}$ -reductasa y la 14 $\alpha$ -desmetilasa por efecto de la risperidona. Por último, el tratamiento con ziprasidona, incluso con la menor dosis (5  $\mu$ M), bloqueó completamente la síntesis de colesterol (**Figura 5**), mientras que la radioactividad aparecía en los siguientes esteroides intermediarios: 7DHC (pico 3), colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11) y colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (pico 12). Esto puede atribuirse a una inhibición de las enzimas  $\Delta^7$ -reductasa y  $\Delta^{14}$ -reductasa, por efecto de la ziprasidona.

### **1.2. Estudio del efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis de colesterol en células HL-60**

Para esclarecer si estos efectos de los SGA tienen carácter general se repitió el experimento, esta vez utilizando la línea celular de promielocitos humanos HL-60, la cual resulta muy útil para este estudio debido a la alta tasa de síntesis de colesterol que presentan para mantener la intensa proliferación celular.



**Figura 5. A: Efecto de los antipsicóticos en la incorporación de acetato radioactivo a esteroides en células HepG2.** Las células se trataron con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona a las concentraciones indicadas o con vehículo (control) y se añadió [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato durante 8 h. **Panel superior.** La incorporación de radioactividad a los esteroides se determinó por HPLC acoplado a un detector de radioactividad. **Panel inferior:** Espectro UV de los esteroides de células no tratadas (control) y tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona (25  $\mu\text{M}$ ). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Los números corresponden a: 1, colesterol; 2, desmosterol; 3, 7DHC; 4, 7-deshidrodesmosterol (7DHD); 8, zimosterol; 11, colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; 12, colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol y 14, lanosterol. El método de HPLC no resuelve entre colesterol y zimosterol y entre desmosterol y zimosterol. El 7DHC (pico 3) se distinguió de colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11) y el 7DHD (pico 4) de colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (pico 12) por su distinto espectro de absorción en UV.



**Figura 6. Efecto de los antipsicóticos en la incorporación de acetato radioactivo a esteroides en células HL-60.** Las células se trataron con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona a las concentraciones indicadas o con vehículo (control) y se añadió  $[^{14}\text{C}]$ -acetato durante 8 h. La incorporación de radioactividad a los esteroides se determinó por HPLC acoplado a un detector de radioactividad. Se muestran los resultados de un experimento representativo. Los números corresponden a: 1, colesterol; 2, desmosterol; 3, 7DHC; 4, 7DHD; 8, zimossterol; 11, colesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; 12, colesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol y 14, lanosterol. El método de HPLC no resuelve entre colesterol y zimossterol y entre desmosterol y zimossterol. El 7DHC (pico 3) se distinguió de colesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11) y el 7DHD (pico 4) de colesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (pico 12) por su distinto espectro de absorción en UV (ver Figura 5).

En condiciones control, estas células acumularon  $[^{14}\text{C}]$ -acetato principalmente en colesterol (pico 1) (**Figura 6**). El tratamiento de las células con haloperidol supuso una profunda reducción de la incorporación de radioactividad al colesterol (pico 1), mientras que se incrementó la radiactividad en 7DHC (pico 3), 7-deshidrodesmosterol (7DHD) (pico 4) y colesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11) (**Figura 6**). El tratamiento con clozapina fue menos potente en cuanto a la inhibición de la biosíntesis de colesterol, aunque con la dosis más alta utilizada se observó un incremento en la incorporación de

[<sup>14</sup>C]-acetato a 7DHC (pico 3), 7DHD (pico 4) y latosterol (pico 5). El tratamiento con risperidona redujo la incorporación de radioactividad al colesterol e incrementó su presencia en 7DHC (pico 3), todo ello de manera dependiente de la dosis, lo que muestra la inhibición de la  $\Delta^7$ -reductasa (**Figura 6**). Por último, la ziprasidona redujo la radioactividad en colesterol y aumentó la de 7DHC (pico 3), colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (pico 11), colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (pico 12) y lanosterol (pico 14), lo que indica la inhibición de las actividades  $\Delta^7$ -reductasa,  $\Delta^{14}$ -reductasa y 14 $\alpha$ -desmetilasa.

### 1.3. Análisis de la composición de esteroides en células HepG2 por CG/EM

Para cuantificar los diferentes esteroides, la técnica de HPLC tiene ciertas limitaciones, principalmente la falta de resolución entre colesterol y zimostenol y entre desmosterol y zimosterol respectivamente. Por ello, para confirmar y profundizar en el estudio de los efectos de los antipsicóticos, analizamos la composición de esteroides mediante CG/EM. En primer lugar utilizamos células HepG2, las cuales fueron incubadas en ausencia (control) o presencia de los distintos antipsicóticos y a distintas concentraciones durante 24 horas. En primer lugar, en la condición control, estas células contienen unos 36  $\mu$ g de colesterol/mg proteína (**Tabla 4**). Además presentan pequeñas cantidades de zimostenol, latosterol y desmosterol. Tras el tratamiento con los distintos antipsicóticos ensayados, el contenido celular de colesterol disminuyó de manera dependiente de la dosis mientras se incrementaron ciertos esteroides precursores. En las células tratadas con haloperidol, se incrementaron notablemente 7DHC, zimostenol, colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol y colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol, y también FF-MAS ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimetilcolestatrienol) y zimosterol con la dosis de haloperidol más alta utilizada (**Tabla 4**). El tratamiento con clozapina incrementó el contenido en zimostenol, 8-deshidrocolesterol (8DHC) y desmosterol. Las células tratadas con risperidona presentaban un incremento en la cantidad de 7DHC, zimosterol, 8DHC, latosterol y desmosterol. Finalmente, en las células tratadas con ziprasidona se observó un incremento en su contenido de 7DHC, y especialmente de colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol y colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (**Tabla 4**).

En resumen, y asumiendo que la inhibición de una enzima resulta en la acumulación de su sustrato, los resultados indican que en las células HepG2, el tratamiento con haloperidol produce la inhibición de las actividades  $\Delta^7$ -reductasa, la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y  $\Delta^{14}$ -reductasa. La clozapina inhibe la  $\Delta^{24}$ -reductasa y la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa.

La risperidona inhibe las actividades de  $\Delta^7$ -reductasa,  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa,  $\Delta^5$ -desaturasa y  $\Delta^{24}$ -reductasa. Y la ziprasidona inhibe la  $\Delta^{14}$ -reductasa y la  $\Delta^7$ -reductasa.

### 1.4. Análisis de la composición de esteroides en otros tipos celulares por CG/EM

Quisimos extender el estudio de la composición de esteroides a otros tipos celulares, para confirmar los resultados observados en las células HepG2 (**Tabla 4**).

La composición de esteroides en las células HL-60 fue algo distinta a la que observada en las células HepG2 (**Tabla 5**). Así, en condiciones controles, las células HL-60 presentan un contenido de colesterol de unos 10  $\mu\text{g}$  de colesterol/mg de proteína celular, unas tres veces inferior que en las células HepG2. Por otro lado, las HL-60 apenas contienen esteroides precursores en la condición control, salvo un poco de 7DHC (**Tabla 5**), a diferencia de las HepG2, que contienen desmosterol (**Tabla 4**). Esto sugiere que en la última parte de la biosíntesis de colesterol (interconversión de esteroides), la enzima limitante en las HL-60 es la  $\Delta^7$ -reductasa, mientras que en las HepG2 es la  $\Delta^{24}$ -reductasa.

A continuación pasamos a analizar el efecto de los antipsicóticos sobre la composición en esteroides. Observamos que a excepción de la clozapina, todos los antipsicóticos redujeron la concentración de colesterol en las células HL-60 (**Tabla 5**). Con haloperidol, incluso a la dosis más baja, el contenido de 7DHC se incrementó tanto que llegó a niveles comparables a los del colesterol en la condición control, y según se aumentaba la dosis fueron aumentando las concentraciones de latosterol, 8DHC y zimosterol, así como de colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol y colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol. Los mismos intermediarios se vieron incrementados en las células tratadas con risperidona y con ziprasidona, pero la intensidad del efecto fue distinta. La risperidona aumentó mucho el contenido de 7DHC, de manera dependiente de la dosis, y, con la mayor dosis, se detectaron también zimostenol y colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, sustratos de la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la  $\Delta^{14}$ -reductasa respectivamente (**Tabla 5**). El tratamiento con ziprasidona produjo un marcado incremento en las concentraciones de colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol, sustratos de la  $\Delta^{14}$ -reductasa, y de 7DHC, sustrato de la  $\Delta^7$ -reductasa; también aumentó el contenido de zimostenol. Por último, el tratamiento con haloperidol, clozapina y risperidona, en todos los casos también produjo un pequeño



## Resultados

---

incremento de la concentración de lanosterol, lo que indica la inhibición de la actividad  $\Delta^5$ -desaturasa.

También estudiamos el efecto de los antipsicóticos sobre la composición de esteroides en la línea celular de neuroblastoma, SH-SY5Y, que se seleccionó porque las neuronas son la principal diana de los antipsicóticos desde el punto de vista terapéutico. En la condición control, el contenido de colesterol fue de unos 36  $\mu\text{g}$  de colesterol/mg proteína, similar al observado en las HepG2. En esa condición, además se detectó 7DHC y lanosterol, lo que sugiere que las actividades  $\Delta^7$ -reductasa y  $\Delta^5$ -desaturasa son limitantes en esta línea celular (**Tabla 6**). En cuanto al efecto de los antipsicóticos, todos ellos disminuyeron el contenido celular de colesterol, incluso con la dosis más baja utilizada. En cuanto a los intermediarios acumulados, el tratamiento con haloperidol 5  $\mu\text{M}$  produjo una intensa elevación de 7DHC (3 veces con respecto al control), y también de colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, zimostenol y lanosterol aunque en menor medida. Al incrementar la dosis de haloperidol, la concentración de 7DHC decreció progresivamente, mientras que aumentaron las de los intermediarios más distales, especialmente colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (**Tabla 6**). Estos resultados pueden atribuirse a la inhibición de las enzimas  $\Delta^7$ -reductasa >  $\Delta^{14}$ -reductasa >  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa, en ese orden de actividad. Cambios similares, salvo en zimostenol, se observaron tras el tratamiento con risperidona y con ziprasidona, aunque en distinto grado, lo que revela la inhibición de las enzimas  $\Delta^7$ -reductasa y  $\Delta^{14}$ -reductasa por acción de estos dos fármacos. Por último, la clozapina produjo un ligero incremento de la concentración de zimostenol, indicativo de la inhibición de la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa (**Tabla 6**). Esto contrasta con el fuerte descenso en el contenido de colesterol por efecto de la clozapina, dependiente de la dosis, lo que sugiere que este fármaco inhibe la biosíntesis de colesterol antes del lanosterol.

	CONTROL	HALOPERIDOL			CLOZAPINA			RISPERIDONA			ZIPRASIDONA		
		5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM
lanosterol	23	22	27	59	14	25	22	–	–	–	–	–	–
dihidrolanosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FF-MAS	–	–	39	134	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MAS-412	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
colesta-8,14,24-trienol	–	(0.33)	(0.60)	(1.60)	–	–	–	–	–	–	(1.10)	(1.08)	(1.02)
colesta-8,14-dienol	–	97	263	2010	–	–	–	–	–	–	3381	3172	2802
T-MAS	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
MAS-414	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
zimosterol	–	–	–	(0.11)	–	–	–	(0.05)	(0.07)	(0.05)	–	–	–
zimostenol	205	159	271	732	257	249	246	206	218	172	–	–	–
8-deshidrocolesterol	29	–	–	–	32	86	–	54	41	31	–	–	–
$\Delta^{7,24}$ -colestadienol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
latosterol	142	40	–	–	105	177	53	–	–	277	–	–	–
7-deshidrodesmosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-deshidrocolesterol	–	1149	1565	1935	–	–	–	566	883	1316	631	–	–
desmosterol	59	–	–	–	69	238	70	115	124	–	–	–	–
colesterol	36476	28156	24475	22919	28158	27893	25382	30606	29364	24710	22263	21640	21720
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	36934	29623 <sup>a</sup>	26640 <sup>a</sup>	27789 <sup>a</sup>	28635	28668	25773	31547 <sup>a</sup>	30630 <sup>a</sup>	26506 <sup>a</sup>	26275 <sup>a</sup>	24812 <sup>a</sup>	24522 <sup>a</sup>

**Tabla 4. Efecto de los antipsicóticos sobre el contenido en esteroides en la línea celular HepG2.** Las células se trataron durante 24 h con los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) a las dosis de 5, 10 y 25 µM, o bien con vehículo (control). Los lípidos se extrajeron y se analizaron por CG/EM. Los datos se expresan en ng de cada esteroide por mg de proteína, a excepción de los esteroides que no pudieron cuantificarse por carecer de patrón, en cuyo caso se expresan como % considerando el área del colesterol como 100% (se muestran entre paréntesis). “Esteroides Totales” se han calculado sin considerar los esteroides que no pueden ser cuantificados <sup>(a)</sup>. Media de dos experimentos. –, no detectado. FF-MAS ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimetilcolestatrienol); MAS-412 ( $\Delta^{8,14}$ -dimetilcolestadienol); T-MAS ( $\Delta^{8,24}$ -dimetilcolestadienol); MAS-414 ( $\Delta^8$ -dimetilcolestanol).

	CONTROL	HALOPERIDOL			CLOZAPINA			RISPERIDONA			ZIPRASIDONA		
		5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM
lanosterol	55	53	72	84	71	47	53	72	83	72	84	123	173
dihidrolanosterol	37	19	–	23	29	16	14	22	–	–	23	20	33
FF-MAS	–	–	–	52	–	–	–	–	–	–	60	86	90
MAS-412	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	125
colesta-8,14,24-trienol	–	–	–	(0.87)	–	–	–	–	–	–	(1.37)	(2.29)	(2.02)
colesta-8,14-dienol	–	74	206	1122	–	–	–	–	–	206	4177	4407	3764
T-MAS	12	9	10	10	13	–	17	8	26	10	–	–	–
MAS-414	–	–	–	–	–	18	–	–	–	–	–	–	–
zimosterol	–	–	–	–	–	–	(1.54)	–	–	–	–	–	–
zimostenol	27	200	371	1051	49	55	70	–	–	371	142	82	43
8-deshidrocolesterol	31	111	106	105	40	38	41	78	153	106	–	–	–
$\Delta^{7,24}$ -colestadienol	–	–	–	–	–	(0.07)	(1.56)	–	–	–	–	–	–
latosterol	143	276	271	291	171	142	127	172	106	271	159	82	65
7-deshidrodesmosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-deshidrocolesterol	204	12044	11800	7352	347	253	317	1318	4253	11800	3434	1977	1239
desmosterol	–	–	–	–	22	24	77	–	–	–	–	–	–
colesterol	10747	5038	4964	5587	11869	10606	9903	10796	7854	4964	5628	5813	6189
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	11256	17824	17800	15677 <sup>a</sup>	12611	11199 <sup>a</sup>	10619 <sup>a</sup>	12466	12475	17800	13707 <sup>a</sup>	12590 <sup>a</sup>	11721 <sup>a</sup>

**Tabla 5. Efecto de los antipsicóticos sobre el contenido en esteroides en la línea celular HL-60.** Las células se trataron durante 24 h con los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) a las dosis de 5, 10 y 25 µM, o bien con vehículo (control). Los lípidos se extrajeron y se analizaron por CG/EM. Los datos se expresan en ng de cada esteroide por mg de proteína, a excepción de los esteroides que no pudieron cuantificarse por carecer de patrón, en cuyo caso se expresan como % considerando el área del colesterol como 100% (se muestran entre paréntesis). “Esteroides Totales” se han calculado sin considerar los esteroides que no pueden ser cuantificados <sup>(a)</sup>. Media de dos experimentos. –, no detectado. FF-MAS ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimetilcolestatrienol); MAS-412 ( $\Delta^{8,14}$ -dimetilcolestadienol); T-MAS ( $\Delta^{8,24}$ -dimetilcolestadienol); MAS-414 ( $\Delta^8$ -dimetilcolestanol).

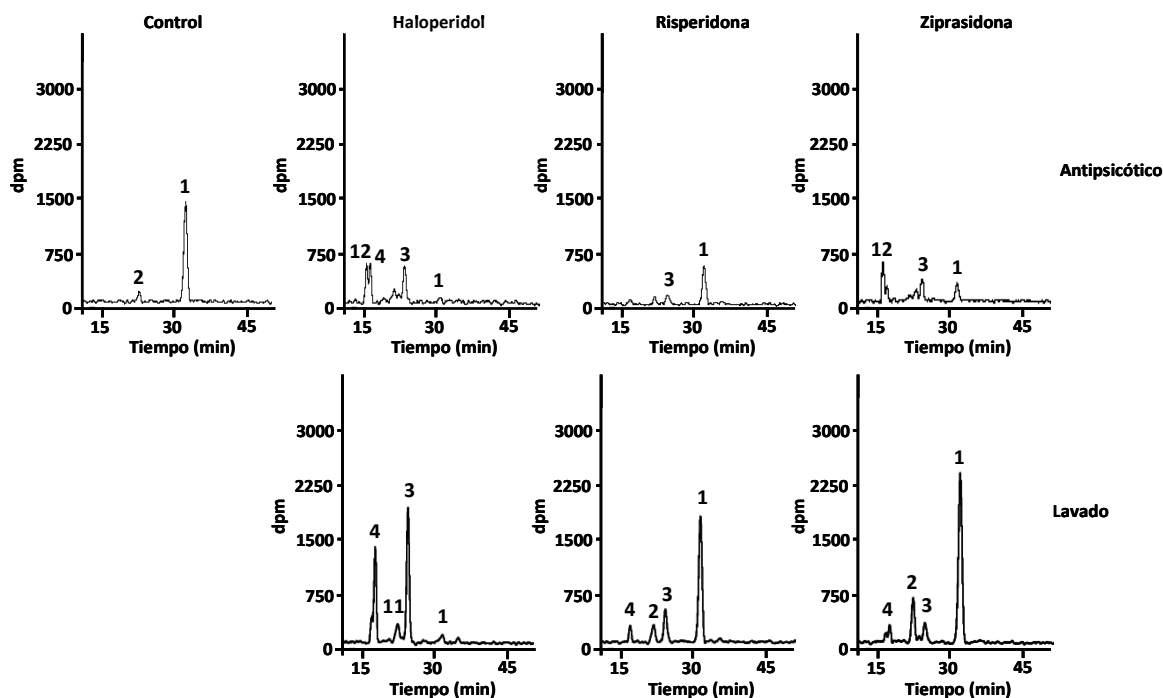
	CONTROL	HALOPERIDOL			CLOZAPINA			RISPERIDONA			ZIPRASIDONA		
		5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM	5µM	10µM	25µM
lanosterol	32	32	–	50	32	–	31	60	44	–	53	68	93
dihidrolanosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FF-MAS	–	143	227	199	–	–	–	45	30	30	576	593	651
MAS-412	–	111	–	216	–	–	–	–	–	–	398	411	465
colesta-8,14,24-trienol	–	(1.34)	(3.07)	(3.35)	–	–	–	–	–	–	(3.48)	(6.49)	(5.73)
colesta-8,14-dienol	271	4184	8999	13893	–	–	–	437	118	104	9325	13943	12361
T-MAS	43	–	–	–	35	35	69	–	–	–	–	–	–
MAS-414	155	64	57	–	97	89	77	–	–	–	–	–	–
zimosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
zimostenol	–	1002	1322	1160	259	302	261	–	–	–	–	–	–
8-deshidrocolesterol	135	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
$\Delta^{7,24}$ -colestadienol	–	–	–	–	–	–	–	(1.59)	(1.85)	–	–	–	–
latosterol	1938	2227	1251	663	1569	1650	860	904	916	626	357	205	186
7-deshidrodesmosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7-deshidrocolesterol	5702	14286	6952	4642	5692	4789	3626	10066	8092	7339	4123	2807	3141
desmosterol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
colesterol	36821	27569	26372	23243	29981	27725	17240	26793	26432	25552	24421	23368	23792
<b>ESTEROLES TOTALES</b>	45097	49618 <sup>a</sup>	45180 <sup>a</sup>	44066 <sup>a</sup>	37665	34590	22164	38305 <sup>a</sup>	35632 <sup>a</sup>	33651	39253 <sup>a</sup>	41395 <sup>a</sup>	40689 <sup>a</sup>

**Tabla 6. Efecto de los antipsicóticos sobre el contenido en esteroides en la línea celular SH-SY5Y.** Las células se trataron durante 24 h con los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) a las dosis de 5, 10 y 25 µM, o bien con vehículo (control). Los lípidos se extrajeron y se analizaron por CG/EM. Los datos se expresan en ng de cada esteroide por mg de proteína, a excepción de los esteroides que no pudieron cuantificarse por carecer de patrón, en cuyo caso se expresan como % considerando el área del colesterol como 100% (se muestran entre paréntesis). “Esteroides Totales” se han calculado sin considerar los esteroides que no pueden ser cuantificados <sup>(a)</sup>. Media de dos experimentos. –, no detectado. FF-MAS ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimetilcolestatrienol); MAS-412 ( $\Delta^{8,14}$ -dimetilcolestadienol); T-MAS ( $\Delta^{8,24}$ -dimetilcolestadienol); MAS-414 ( $\Delta^8$ -dimetilcolestanol).

### 2. CAMBIOS EN LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL TRAS RETIRAR LOS ANTIPSICÓTICOS DEL MEDIO DE CULTIVO (PERIODO DE LAVADO)

Los resultados anteriormente expuestos muestran que el tratamiento con los distintos antipsicóticos produce la inhibición de diversas enzimas de la biosíntesis de colesterol, que conduce a la disminución del contenido de colesterol y la acumulación de determinados esteroides precursores en la célula. En contraposición a nuestros resultados, otros autores habían mostrado que el pretratamiento de hepatocitos de rata con clozapina (Lauessergues et al., 2010) y con risperidona (Lauessergues et al., 2011) incrementaba la incorporación de [ $^{14}$ C]-acetato a colesterol, mientras que el haloperidol no la afectaba (Lauessergues et al., 2010). Estos resultados se obtuvieron determinando la biosíntesis de colesterol 4 horas después de retirar los antipsicóticos del medio de cultivo.

A la vista de esta discrepancia, nos pareció oportuno estudiar en nuestras condiciones, la biosíntesis de colesterol tras retirar los antipsicóticos del medio de cultivo (periodo de lavado). Para ello, las células HepG2 se trataron con haloperidol, risperidona y ziprasidona, separadamente, durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, un grupo de células se expusieron a los antipsicóticos durante 8 horas más y a otro grupo se les retiró el medio, se lavaron y se añadió medio nuevo sin los antipsicóticos. En las últimas 8 horas de incubación se estudió la incorporación de [ $^{14}$ C]-acetato a los esteroides. Como se muestra en la **figura 7**, en todos los casos, la eliminación de los antipsicóticos del medio de cultivo, se acompañaba de un incremento de la incorporación de radioactividad a los esteroides, incluido el colesterol, alcanzándose unos niveles que en algunos casos superaban los observados en las células controles, no expuestas a los antipsicóticos en el periodo precedente. Esos resultados demuestran, por un lado que la inhibición que ejercen los antipsicóticos mientras están presentes, es reversible. Por otro lado, sugieren que la exposición a estos fármacos desencadena una respuesta homeostática, con aumento de la transcripción de las enzimas de la colesterogénesis, que se manifiesta en una activación de la biosíntesis de colesterol una vez se retiran los antipsicóticos del medio.



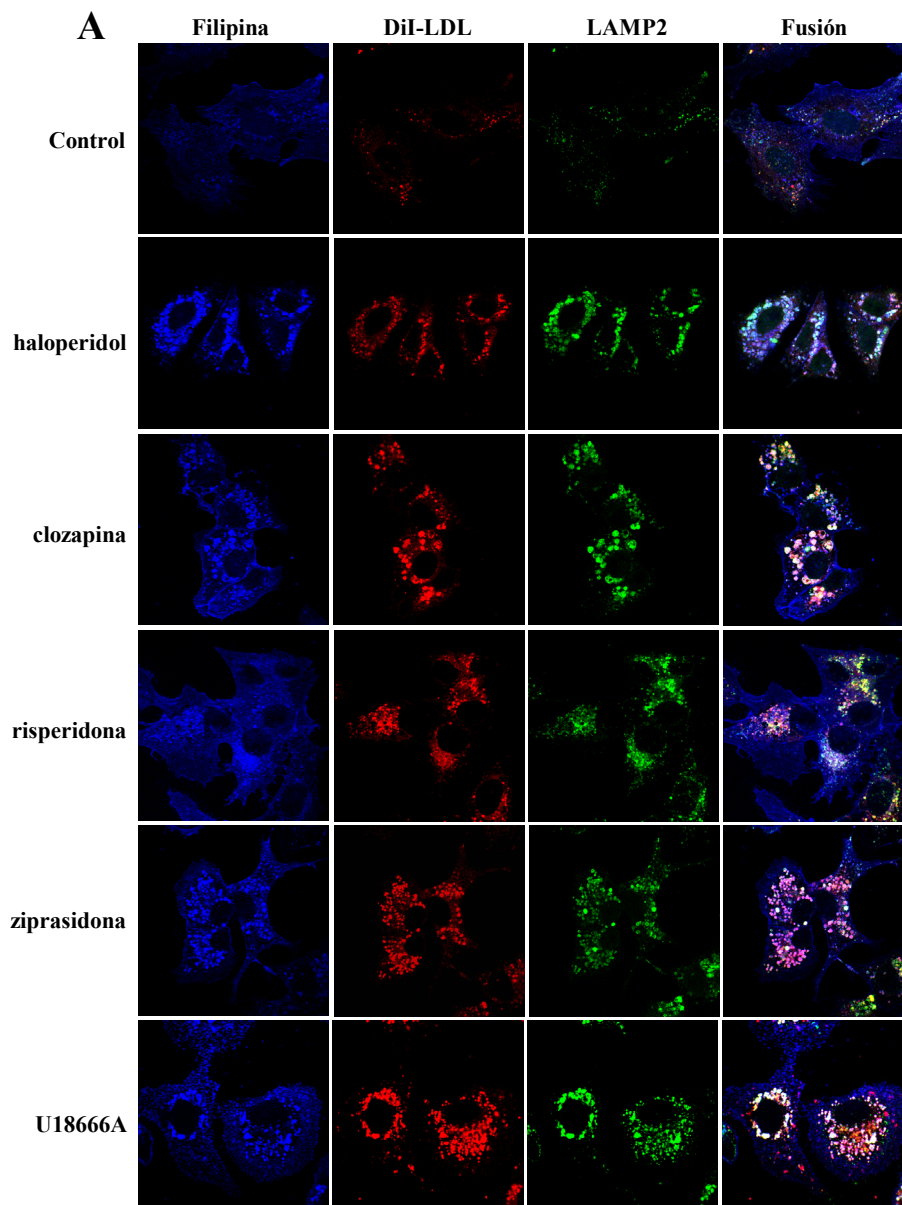
**Figura 7.** Efecto de la retirada de los antipsicóticos del medio de cultivo, en la incorporación de acetato radioactivo a esterolos. Las células HepG2 fueron tratadas con haloperidol, risperidona o ziprasidona a una concentración de 10  $\mu$ M o con vehículo (control) durante 16 h, después se añadió  $^{14}$ C-acetato durante 8 h en ausencia (lavado) o presencia de los antipsicóticos. Los números corresponden a: 1, colesterol; 2, desmosterol; 3, 7DHC; 4, 7DHD; 11, colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; 12, colest-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol.

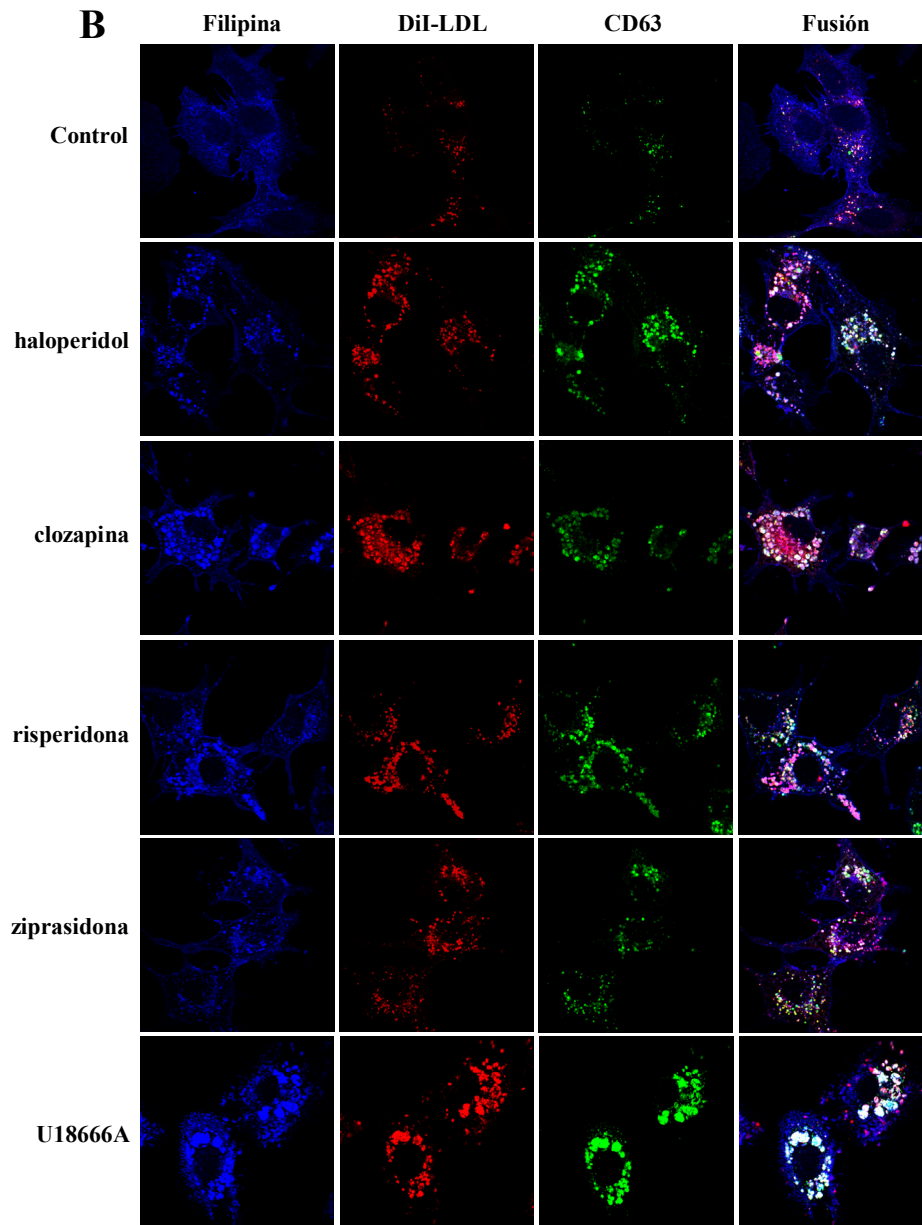
### 3. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE EL TRÁFICO INTRACELULAR DE COLESTEROL DE LAS LDL

Los antipsicóticos son aminas anfipáticas con la capacidad de interferir en la vía endocítica, como ya había sido demostrado para el haloperidol en nuestro laboratorio (Sánchez-Wandelmer et al., 2010), así como para la clozapina (Kristiana et al., 2010). En este trabajo quisimos profundizar en este estudio y extenderlo a otros antipsicóticos. Como control positivo empleamos U18666A, que es un inhibidor del tráfico intracelular de colesterol a nivel del endo-lisosoma ampliamente utilizado a tal efecto (Liscum and Faust, 1989). Las células HepG2 fueron incubadas con LDL marcadas con DiI (DiI-LDL) a una concentración de 30  $\mu$ g de colesterol/ml de medio de cultivo y se expusieron o no (control) a los antipsicóticos a una concentración de 10  $\mu$ M o al U18666A (5  $\mu$ M) durante 24 horas. Tras el tratamiento las células se tiñeron con filipina para detectar el colesterol libre y con anti-LAMP2 o anti-CD63 para marcar los lisosomas, y fueron analizadas por microscopía confocal. Como se puede observar en la

## Resultados

**figura 8**, el tratamiento con los antipsicóticos produjo una acumulación de gránulos perinucleares brillantemente marcados con filipina, que a la vez eran positivos para LAMP2 y CD63, indicando que el depósito de colesterol libre se producía en el compartimento endo-lisosomal (**Figura 8**). Lo mismo ocurría cuando tratamos las células con U18666A. Es ilustrativo que el marcaje de filipina co-localizaba con el de DiI, lo que indica que el colesterol acumulado proviene de las LDL. Estos resultados sugieren que los SGA interfieren en la salida de colesterol desde los endo-lisomas hacia otros compartimentos subcelulares





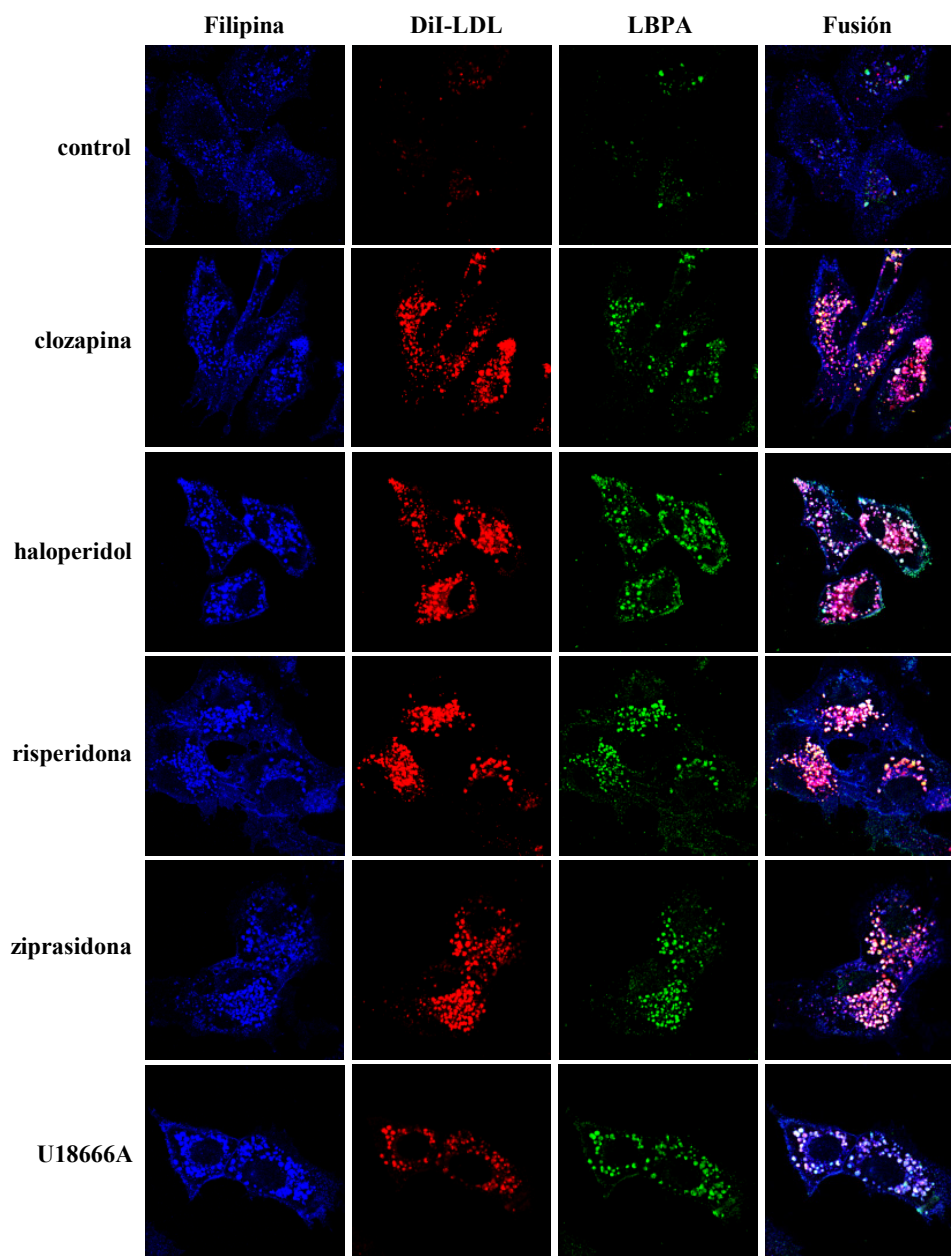
**Figura 8. Efecto de los antipsicóticos sobre la acumulación de LDL en los endo-lisomas.** Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M o U18666A 5  $\mu$ M fueron incubadas en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol). **A:** Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para LAMP2, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal. **B:** Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para CD63, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal. Los resultados que se muestran son representativos de tres experimento independientes.



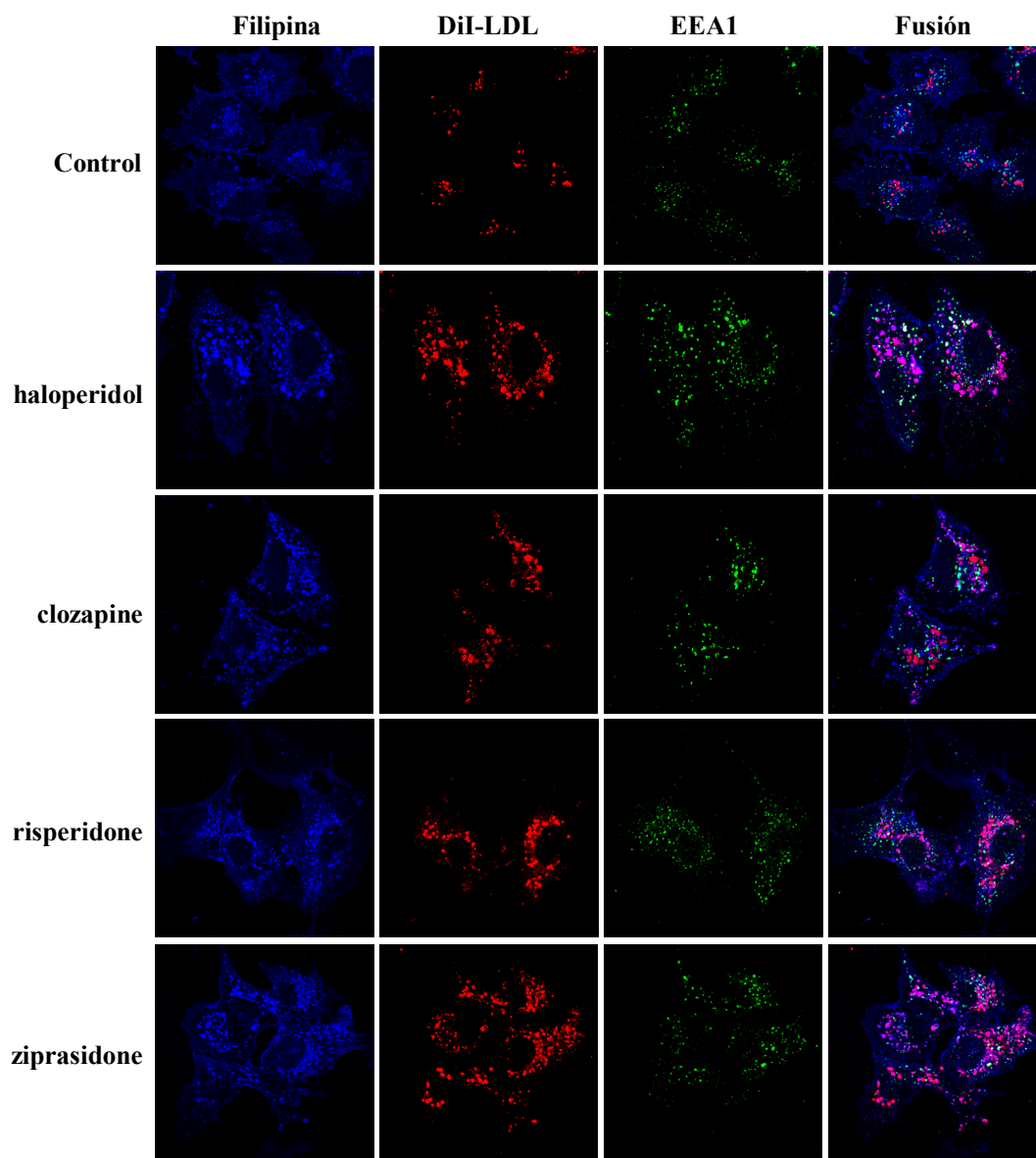
Para confirmar qué tipo de vesículas se acumulaban por efecto de los antipsicóticos, las células se tiñeron con un anticuerpo frente a ácido lisobisfosfatídico (LBPA), un fosfolípido presente en la membrana luminal de los endosomas/lisosomas (Piccoli et al., 2011). Como se observa en la **figura 9**, el tratamiento con los antipsicóticos o U18666A produce la acumulación de gránulos intensamente teñidos con filipina, que son positivos para LBPA y además colocalizan con DiI. Estos datos reafirman que los antipsicóticos producen un bloqueo del tráfico intracelular de las LDL a nivel del compartimento endo-lisosomal, provocando la acumulación de colesterol libre y LBPA.

A continuación quisimos averiguar qué ocurría en etapas anteriores de la vía endocítica. Para ello utilizamos un anticuerpo frente a un antígeno presente en los endosomas tempranos: EEA. Como puede observarse en la **figura 10**, en las células tratadas con antipsicóticos no se apreciaron cambios en la distribución e intensidad de la señal, en comparación con el control. Este resultado permite concluir que el bloqueo del tráfico del colesterol-LDL que provocan los antipsicóticos (FGA y SGA) solo ocurre en el compartimento endosoma tardío/lisosomal y no en los endosomas tempranos (**Figura 10**).

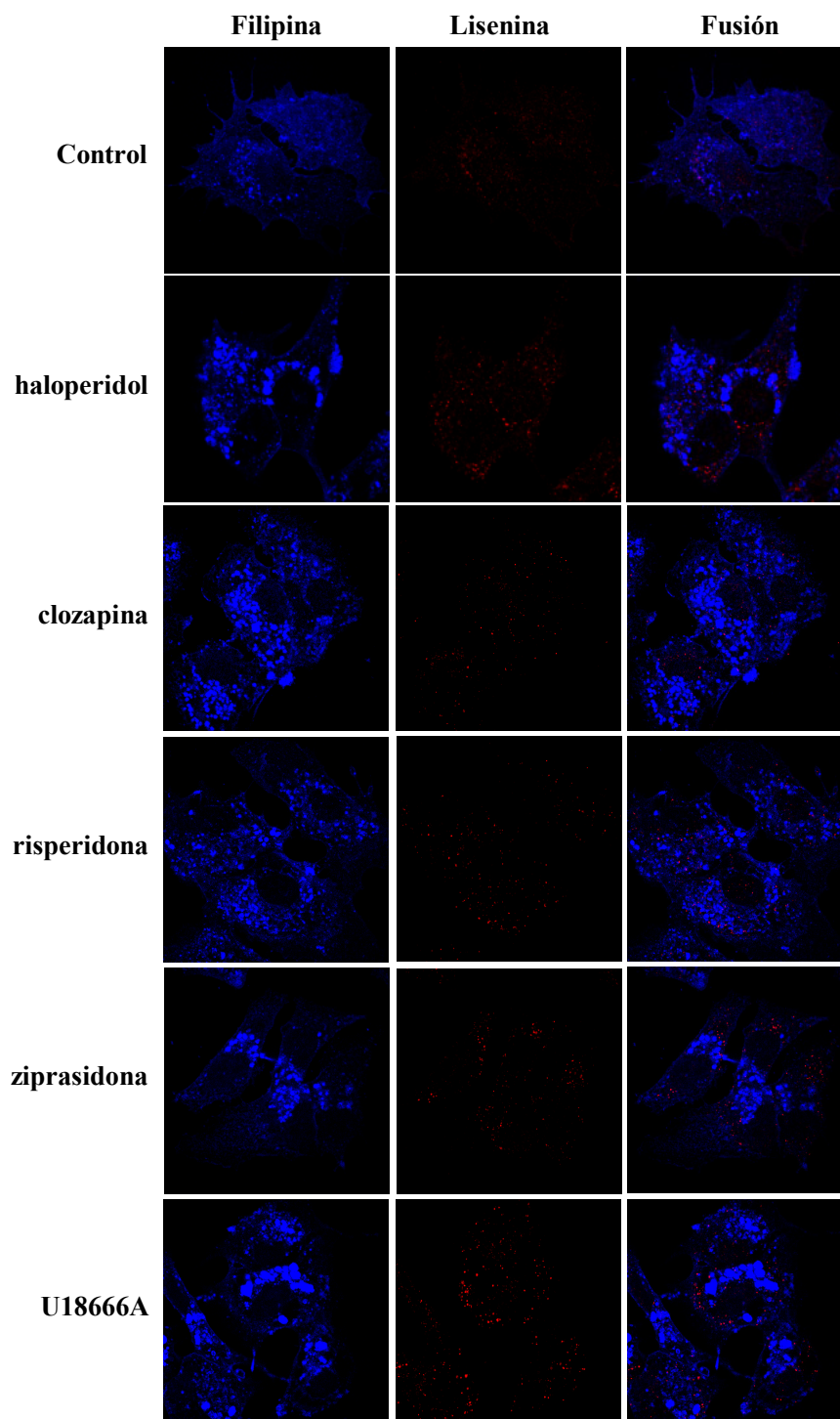
Otra pregunta que nos parecía interesante resolver era si aparte del colesterol, los antipsicóticos producían la acumulación de otros lípidos que también son transportados por las LDL, tomando como referencia la deficiencia de NPC1, en la que hay un defecto en el transporte de las LDL que conduce a la acumulación de colesterol libre, esfingosina y esfingolípidos en el endo-lisosoma (Lloyd-Evans et al., 2008). Para ello, las células fueron expuestas a lisenina, una proteína con alta afinidad por la esfingomielina, que después fue detectada con un anticuerpo anti-lisenina. Como se muestra en la **figura 11**, las células tratadas con los antipsicóticos no acumularon más esfingolípidos en el compartimento endo-lisosomal comparadas con las células control. Sin embargo, una mayor tinción para lisenina se observó en las células tratadas con U18666A. Con estas imágenes podemos concluir que los antipsicóticos no interfieren en el tráfico de esfingolípidos desde los endo-lisosomas hacia otros compartimentos celulares, a diferencia de lo que ocurre en la enfermedad de Niemann-Pick C.



**Figura 9. Efecto de los antipsicóticos sobre la acumulación de LBPA en los endo-lisomas.** Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M o U18666A 5  $\mu$ M fueron incubadas en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol). Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para LBPA, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal.



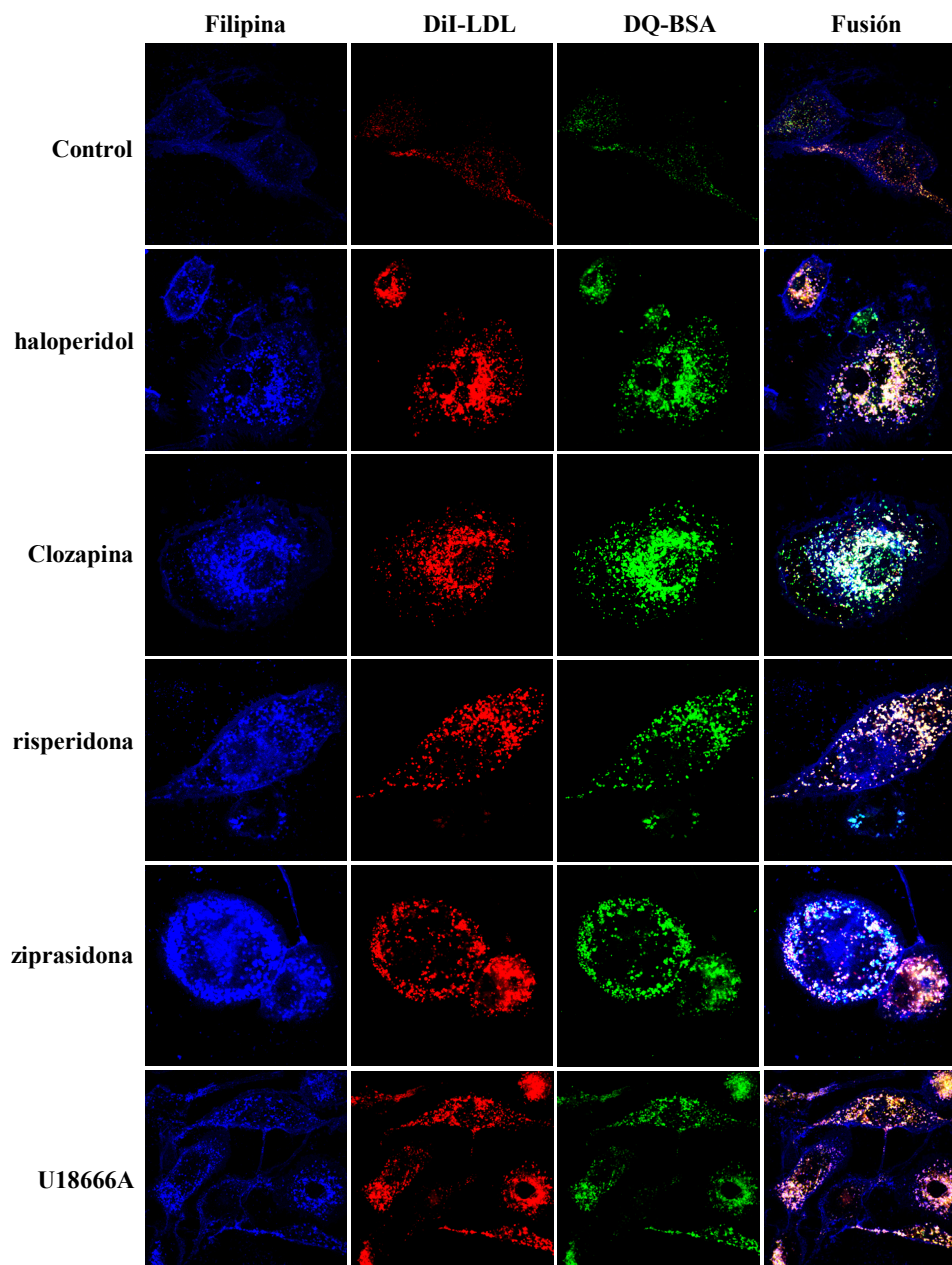
**Figura 10. Efecto de los antipsicóticos sobre la acumulación de LDL en los endosomas tempranos.** Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M fueron incubadas en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol). Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para EEA1, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal.



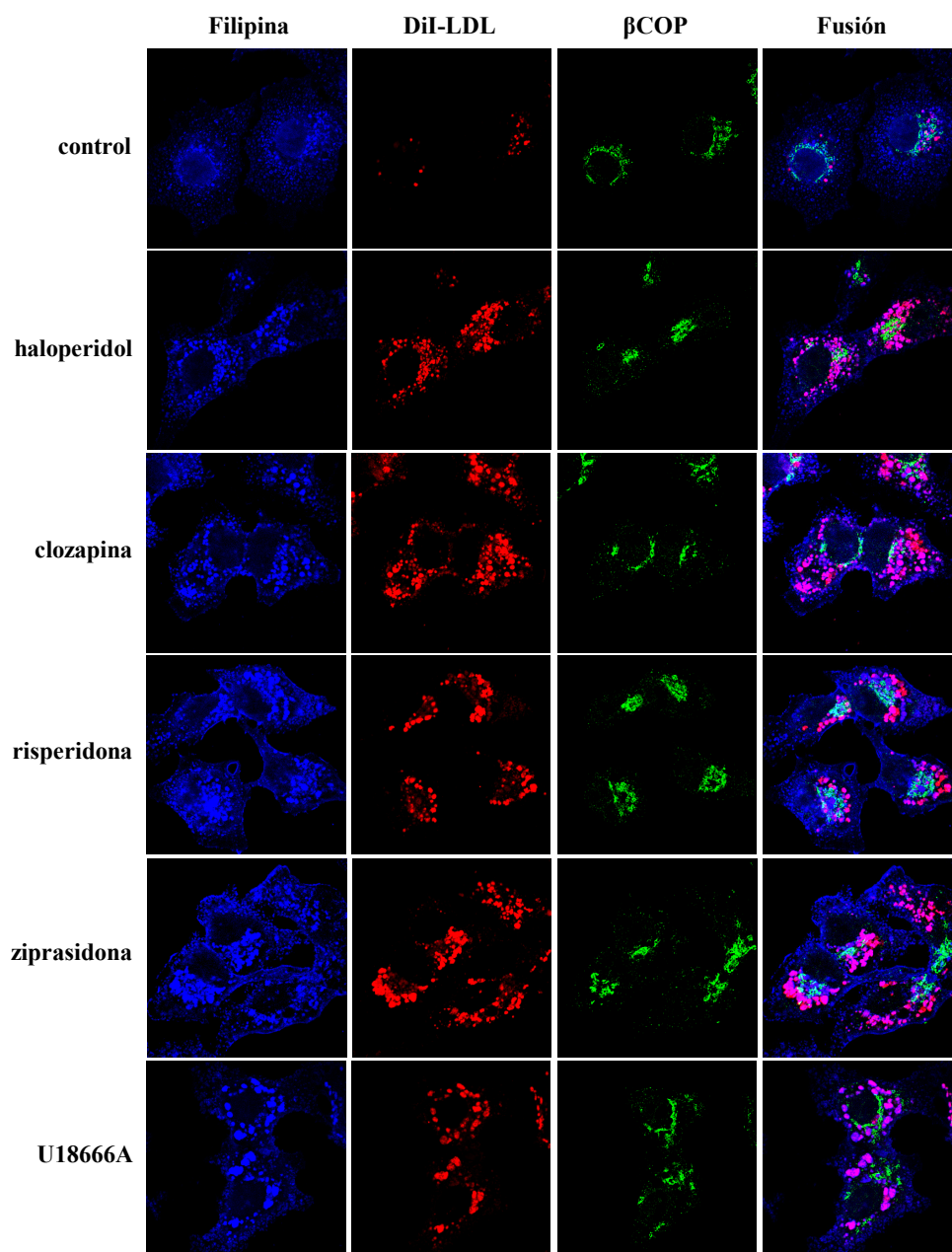
**Figura 11. Efecto de los antipsicóticos sobre la acumulación de esfingomiélin.** Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu\text{M}$  o U18666A 5  $\mu\text{M}$  fueron incubadas en presencia de LDL (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de colesterol). Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para lisenina, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal.

Al centrarse el efecto de los antipsicóticos en el compartimento endolisosomal, quisimos averiguar si los antipsicóticos afectaban de algún modo la funcionalidad de las proteasas presentes en este compartimento. Para llevar a cabo este estudio utilizamos DQ™ BSA (DQ-BSA), un derivado de albúmina marcado con BODIPY® FL que inicialmente no emite fluorescencia. Después de su unión a los receptores Fc, el complejo es internalizado y tras la hidrólisis de la proteína, emite fluorescencia. Ya que el complejo es internalizado mediante receptores Fc, se necesita otro modelo celular, distinto de las HepG2, donde se exprese dicho receptor. Para ello utilizamos células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Estas células fueron tratadas con los distintos antipsicóticos o U18666A e incubadas con DiI-LDL, así como con DQ-BSA. En todos estos casos comprobamos la presencia de señal fluorescente del DQ-BSA procesado, incluso con mayor intensidad que en el control, lo que indica que los antipsicóticos no afectan la actividad de, al menos, las proteasas ácidas lisosomales (**Figura 12**).

Por último, analizamos otro compartimento celular clave en el tráfico intracelular de lípidos, como es el aparato de Golgi. Para ello, las células HepG2 fueron incubadas con DiI-LDL y tratadas con los antipsicóticos o U18666A como anteriormente. Una vez finalizado el tratamiento, las células se tiñeron con filipina y con un anticuerpo frente a la proteína  $\beta$ COP del Golgi y se analizaron por microscopía confocal. La **figura 13** muestra claramente que no se produce ninguna acumulación de DiI o de colesterol libre en el aparato de Golgi, ni se altera su disposición en la célula.



**Figura 12. Efecto de los antipsicóticos sobre la actividad de las proteasas lisosomales.** Los macrófagos THP-1 sin tratar (control) o tratados con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M o U18666A 5  $\mu$ M fueron incubados en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol). Cuatro h antes de la fijación se añadió DQ-BSA 1  $\mu$ g/ml. Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal.



**Figura 13. Efecto de los antipsicóticos sobre la acumulación de LDL en el aparato de Golgi.** Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M o U18666A 5  $\mu$ M fueron incubadas en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol). Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron para colesterol con filipina y para  $\beta$ -COP, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal.

### 4. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Nos planteamos la hipótesis de que la inhibición de la biosíntesis de colesterol y el bloqueo del tráfico del colesterol procedente de LDL por efecto de los antipsicóticos, podría resultar en la activación de los factores de transcripción SREBP y, con ello, la expresión de sus genes diana, lo que produciría una estimulación transitoria de la biosíntesis de lípidos tras la eliminación de los antipsicóticos del medio de cultivo. Para analizar esta hipótesis, primero determinamos los niveles de expresión de *SREBF2*, *HMGR* y *LDLR* que están regulados por la forma activa de SREBP-2. Las células HepG2 fueron incubadas en medio LPDS suplementado con LDL (30 µg de colesterol/ml), en presencia de los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) a 10 µM durante 2, 4, 16 horas o bien 16 horas en presencia de los mismos más 8 horas después de haberlos retirado del medio y poner medio sin antipsicóticos (16h+8h). En la condición control (sin antipsicóticos), tras la adición de las LDL las células sufrieron un descenso en la expresión de estos genes, atribuible a la acreción de colesterol (**Tabla 7**). En las células tratadas con los antipsicóticos, se observa un incremento en la expresión de los genes *SREBF2*, *HMGR* y *LDLR* con respecto a la condición control, sobre todo a tiempos cortos, persistiendo a las 16 horas el efecto para algunos antipsicóticos (**Tabla 7**).

Durante el periodo de lavado (16h+8h), debido a la retirada de las LDL del medio de cultivo, la expresión de *SREBF2* y *LDLR* tendió a aumentar en todos los tratamientos, incluso en el control con respecto al tiempo 16 horas (**Tabla 7**). En general, este efecto rebote fue mas pronunciado en las células pretratadas con los antipsicóticos, sobre todo en el caso del *LDLR*, en el que el test ANOVA para los factores antipsicótico y lavado, muestra que existe una interacción entre ambos ( $p < 0.0001$ ). No obstante, al final del tiempo de lavado, los niveles de ARNm para *SREBF2*, *LDLR* y *HMGR* en las células tratadas previamente con clozapina, estaban significativamente aumentados con respecto al control. Con risperidona y ziprasidona también se detectó un fuerte efecto rebote, pero sólo para *LDLR* y *HMGR*, aunque los niveles de ARNm no superaron los niveles observados en el control en el caso de la ziprasidona (**Tabla 7**). Hay que destacar que, a diferencia de los otros genes, los niveles de ARNm de *HMGR*, en la mayoría de los casos no se incrementaron tras la eliminación de las LDL del medio de cultivo; de hecho, en las células previamente tratadas con haloperidol y ziprasidona, la expresión de *HMGR* disminuyó significativamente con



respecto al tiempo 16 horas; aun así, en la mayoría de los casos (haloperidol, clozapina y risperidona), los niveles de ARNm de *HMGR* permanecieron elevados con respecto al control (**Tabla 7**).

Aunque la actividad del factor de transcripción SREBP-1 está regulada por diversos factores, la disminución del colesterol libre en la membrana del RE se conoce que fomenta su activación (**Figura 3**), por ello quisimos analizar la expresión de dos de sus genes diana: *SREBF1* y *FASN*. En las células incubadas en la condición control, la expresión de ambos genes descendió en respuesta a la presencia de LDL en el medio de cultivo, y no hubo cambios significativos tras la retirada de las LDL (16h+8h) (**Tabla 8**). En las células tratadas con los antipsicóticos, los niveles de ARNm de *SREBF1* y *FASN* estaban aumentados con respecto al control, especialmente a tiempos cortos.

Tras la retirada de las LDL, con respecto al control observamos un ligero descenso en los niveles de ARNm de *SREBF1* en las células previamente tratadas con los antipsicóticos haloperidol, risperidona y ziprasidona, no observándose cambios con la clozapina (**Tabla 8**). En el caso de la expresión de *FASN*, la clozapina produjo un aumento significativo y la ziprasidona una disminución con respecto al control, no habiendo cambios significativos en las células tratadas con haloperidol y risperidona.

En el periodo de lavado, en comparación con el tiempo 16 horas, no se observaron cambios significativos en la expresión de *SREBF1* en las células tratadas con haloperidol, clozapina o risperidona mientras que descendió claramente en las células tratadas con ziprasidona (**Tabla 8**). Con respecto a *FASN*, el lavado en las células tratadas previamente con los antipsicóticos, excepto risperidona, se acompañó de un fuerte descenso de los niveles de ARNm.

También medimos la expresión de *ABCA1*, que está gobernada principalmente por LXR (Tall, 2008). En la condición control no se detectaron cambios en respuesta a las LDL ni tras el lavado (**Tabla 8**). En las células tratadas con los antipsicóticos no se observaron grandes cambios en comparación con el control, a excepción de una ligera disminución a las 4 horas en las células tratadas con ziprasidona y un ligero incremento a las 2 horas en células tratadas con haloperidol.

## Resultados

	Control	Haloperidol	Clozapina	Risperidona	Ziprasidona
<b>SREBF2</b> 0 h	1.000±0.038				
2 h	0.823±0.069	1.124±0.074***	1.254±0.062****	1.045±0.038**	1.192±0.070***
4 h	0.911±0.061	1.460±0.101****	1.081±0.041	1.041±0.108	1.186±0.065**
16 h	0.517±0.055####	0.854±0.059***	0.743±0.099*	0.545±0.071	0.588±0.065
16 h+8 h	0.734±0.040	0.958±0.084**	0.869±0.024*	0.695±0.029	0.828±0.051
<b>HMGR</b> 0 h	1.000±0.052				
2 h	0.806±0.061	1.086±0.082***	1.209±0.029****	1.048±0.054**	1.075±0.057***
4 h	0.659±0.050##	1.294±0.101****	1.206±0.051****	0.814±0.020*	0.832±0.040*
16 h	0.263±0.014####	0.525±0.038****	0.746±0.037****	0.245±0.011	0.447±0.035****
16 h+8 h	0.300±0.020	0.354±0.019**,+	0.659±0.014****	0.369±0.012**,+	0.235±0.011**,+
<b>LDLR</b> 0 h	1.000±0.026				
2 h	0.748±0.035###	0.978±0.046**	1.355±0.078****	1.022±0.046***	1.185±0.040****
4 h	0.548±0.022####	1.104±0.081****	1.313±0.035****	0.708±0.012**	0.770±0.018***
16 h	0.448±0.020####	0.474±0.044	0.685±0.032****	0.337±0.021**	0.297±0.012***
16 h+8 h	0.600±0.059++++	0.552±0.020 <sup>+</sup>	0.869±0.024****,++++	0.715±0.051*,++++	0.400±0.015***,+

**Tabla 7. Efecto de los antipsicóticos sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico.** Las células HepG2 se cultivaron en medio con LPDS. Al tiempo 0, se les añadió LDL (30 µg/ml de colesterol) y los diferentes antipsicóticos a 10 µM o no (control) y las células se dejaron incubar durante 2, 4, 16 h o 16 h más 8 h adicionales (16 h + 8 h) tras retirar el medio y ser sustituido por uno sin LDL. A los tiempos indicados, se extrajo el ARN y las especies se cuantificaron mediante RT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión del ARNm de Rplp0. La expresión se expresa como la media ± EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para el estudio estadístico se realizó un ANOVA para ver el efecto de los distintos antipsicóticos sobre la expresión de genes y otro para comprobar el efecto de las LDL a lo largo del tiempo sobre la expresión génica en el control. Además, para el estudiar el efecto del lavado sobre los niveles de ARNm, realizamos una ANOVA para los factores lavado y antipsicótico. En todos los casos, posteriormente se realizó el test de Bonferroni. Las comparaciones estadísticas son frente al control (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) o los distintos tiempos en el control frente al tiempo 0 h (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ , ####  $p < 0.0001$ ) o tiempo 16 h + 8 h frente a tiempo 16 h (<sup>+</sup>  $p < 0.05$ , <sup>++</sup>  $p < 0.01$ , <sup>+++</sup>  $p < 0.001$ , <sup>++++</sup>  $p < 0.0001$ ).

	Control	Haloperidol	Clozapina	Risperidona	Ziprasidona
<b>SREBF1</b> 0 h	1.000±0.015				
2 h	1.021±0.017	1.228±0.044****	0.964±0.032	0.962±0.011	0.967±0.032
4 h	0.737±0.027###	0.930±0.029***	1.474±0.075****	1.150±0.028****	0.976±0.021***
16 h	0.840±0.034##	0.741±0.021**	0.928±0.028*	0.876±0.014	0.955±0.037**
16 h+8 h	0.882±0.023	0.715±0.015****	0.914±0.013	0.776±0.028***	0.689±0.019****,++++
<b>FASN</b> 0 h	1.000±0.018				
2 h	0.933±0.023	1.200±0.044****	1.035±0.012**	0.918±0.033	1.018±0.018*
4 h	0.704±0.022####	1.357±0.135****	1.026±0.057***	0.909±0.018*	0.877±0.013*
16 h	0.476±0.021####	0.867±0.046****	0.744±0.035****	0.462±0.016	0.595±0.013**
16 h+8 h	0.451±0.020	0.457±0.016++++	0.580±0.024****,+	0.468±0.019	0.352±0.028**,+
<b>ABCA1</b> 0 h	1.000±0.050				
2 h	1.026±0.054	1.200±0.031**	1.013±0.048	1.048±0.053	1.046±0.011
4 h	1.130±0.039	0.986±0.040	1.111±0.065	1.017±0.107	0.885±0.035**
16 h	0.938±0.061	0.955±0.030	0.914±0.060	0.888±0.052	0.907±0.025
16 h+8 h	1.007±0.043	1.051±0.049	1.042±0.055	0.931±0.035	1.107±0.058 <sup>+</sup>

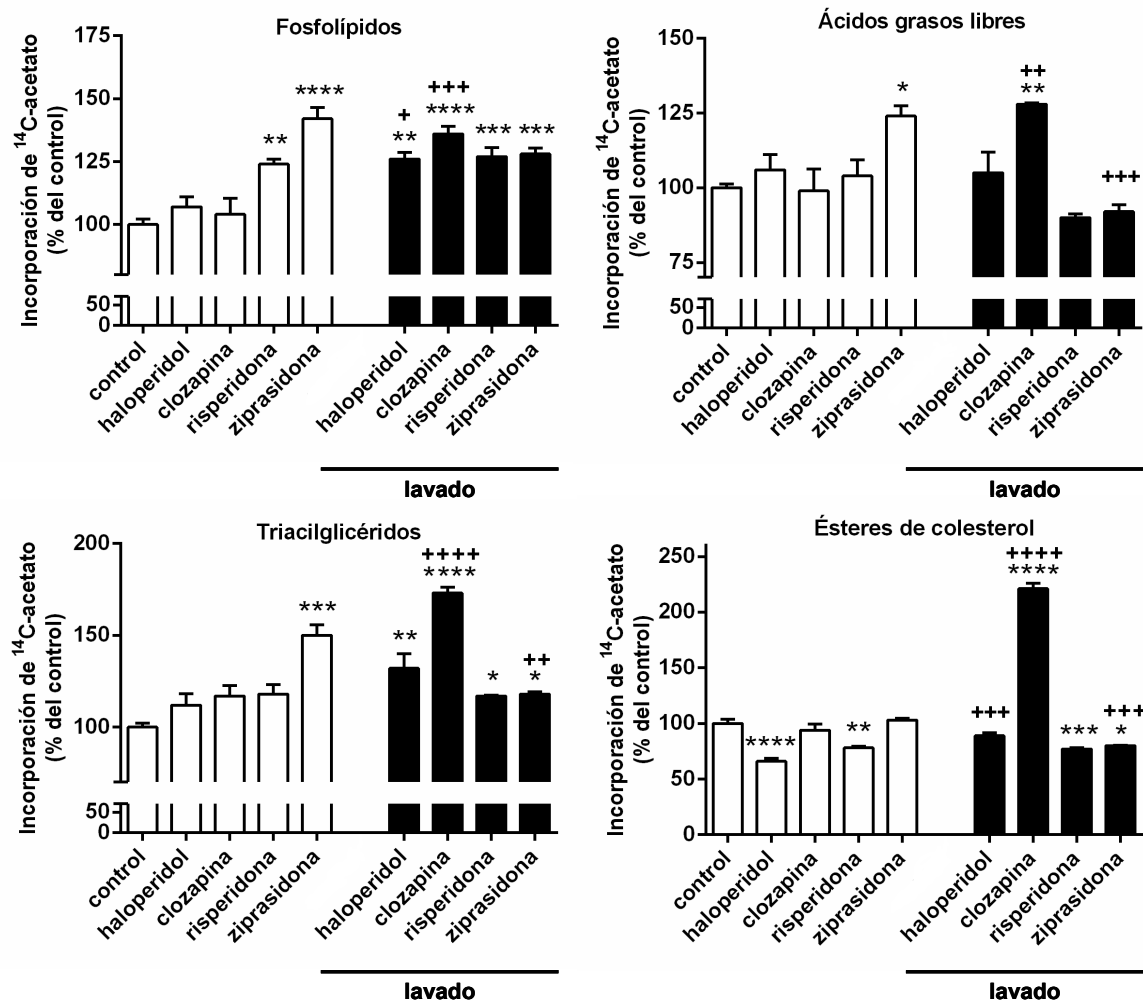
**Tabla 8. Efecto de los antipsicóticos sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico.** Las células HepG2 se cultivaron en medio con LPDS. Al tiempo 0, se les añadió LDL (30 µg/ml de colesterol) y los diferentes antipsicóticos a 10 µM o no (control) y las células se dejaron incubar durante 2, 4, 16 h o 16 h más 8 h adicionales (16 h + 8 h) tras retirar el medio y ser sustituido por uno sin LDL. A los tiempos indicados, se extrajo el ARN y las especies se cuantificaron mediante RT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión del ARNm de Rplp0. La expresión se expresa como la media ± EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para el estudio estadístico se realizó un ANOVA para ver el efecto de los distintos antipsicóticos sobre la expresión de genes y otro para comprobar el efecto de las LDL a lo largo del tiempo sobre la expresión génica en el control. Además para el estudiar el efecto del lavado sobre los niveles de ARNm, realizamos una ANOVA para los factores lavado y antipsicótico. En todos los casos posteriormente se realizó el test de Bonferroni. Las comparaciones estadísticas son frente al control (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) o los distintos tiempos en el control frente al tiempo 0 h (#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ , ####  $p < 0.0001$ ) o tiempo 16 h + 8 h frente a tiempo 16 h (<sup>+</sup>  $p < 0.05$ , <sup>++</sup>  $p < 0.01$ , <sup>+++</sup>  $p < 0.001$ , <sup>++++</sup>  $p < 0.0001$ ).

## 5. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA INCORPORACIÓN DE [<sup>14</sup>C]-ACETATO A LOS ÁCIDOS GRASOS LIBRES Y LÍPIDOS SAPONIFICABLES

Conocido el efecto de los antipsicóticos sobre la biosíntesis de colesterol y sobre los genes implicados en la síntesis de lípidos, quisimos investigar el posible efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis de *novo* de otros lípidos celulares. Para ello, determinamos la incorporación de [<sup>14</sup>C]-acetato a los ácidos grasos libres, fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol, en las células HepG2. Realizamos dos tipos de experimentos. En el primero, el [<sup>14</sup>C]-acetato fue añadido estando presentes los antipsicóticos (10 µM) en el medio. En el segundo experimento, las células fueron tratadas previamente con los antipsicóticos (10 µM) durante 20 horas, después se retiró el medio, se añadió uno fresco sin los antipsicóticos pero con el trazador y se incubaron las células durante 4 horas más.

Cuando la síntesis de lípidos fue analizada estando los antipsicóticos presentes en el medio de cultivo, la ziprasidona incrementó la incorporación de [<sup>14</sup>C]-acetato a fosfolípidos y triglicéridos, los lípidos mayoritarios en las células, y también a ácidos grasos libres, mientras que la risperidona incrementó significativamente la síntesis de triglicéridos (**Figura 14**). En esta condición, el haloperidol y la clozapina no ejercieron efectos apreciables, si acaso inhibieron la síntesis de ésteres de colesterol (**Figura 14**).

Al analizar la síntesis de lípidos en el periodo de lavado, pudimos observar un incremento significativo en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos al usar cualquiera de los cuatro antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) en comparación con el control (**Figura 14**). La clozapina incrementó también la síntesis de ácidos grasos libres y ésteres de colesterol, mientras que la risperidona y la ziprasidona disminuyeron entre un 10 y un 20% la síntesis de estos lípidos, con respecto al control (**Figura 14**). En términos generales, el antipsicótico más activo en la estimulación de la síntesis de lípidos fue la ziprasidona, cuando ésta estaba presente en el medio, y en el periodo de lavado el antipsicótico más activo fue la clozapina.

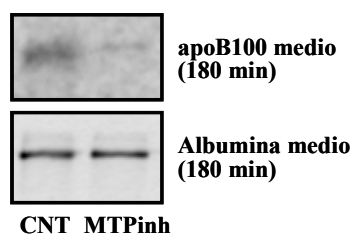


**Figura 14. Efecto de los antipsicóticos sobre la incorporación de acetato radioactivo a fosfolípidos, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol en células HepG2.** Las células se trataron con los antipsicóticos (10  $\mu$ M) o con vehículo (control) durante 24 h, y 4 h antes de terminar el experimento se añadió <sup>14</sup>C-acetato. En un segundo diseño experimental (lavado), 4 h antes de terminar el experimento se lavaron las células para eliminar el antipsicótico del medio y se añadió el acetato radioactivo. Al finalizar el experimento, las células se recogieron para analizar la incorporación de radioactividad a los grupos de lípidos mayoritarios, mediante TLC. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. La media del grupo control se tomó como el 100% y el resto de datos se normalizaron frente al control. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y lavado, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Se muestran las comparaciones estadísticas frente al control (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) y de la condición de lavado frente a sin lavado (+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ , +++  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

## 6. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SECRECIÓN DE APOB

Una vez demostrado que la síntesis de lípidos saponificables estaba incrementada por efecto de los antipsicóticos, especialmente tras el lavado de los mismos, quisimos estudiar la síntesis y secreción de apoB. Para ello utilizamos la línea celular HepG2, que ha sido descrita como un buen modelo para este estudio (Meex et al., 2011).

Las células se expusieron a [<sup>35</sup>S]-metionina durante 15 minutos, como marcador metabólico, después se dejaron 3 horas en medio libre de [<sup>35</sup>S]-metionina y posteriormente se inmunoprecipitó la apoB para cuantificar la radioactividad incorporada. Para demostrar que la secreción e inmunoprecipitación de la apoB eran específicas, en un primer experimento tratamos las células con el inhibidor de la enzima MTP, CP-346086, observando que se anulaba totalmente la secreción de apoB al medio (**Figura 15**). Este resultado está de acuerdo con el papel de la MTP en la incorporación de los lípidos a las lipoproteínas en formación y con el hecho de que si la apoB no se carga de lípidos, se degrada vía proteasoma (Meex et al., 2011).

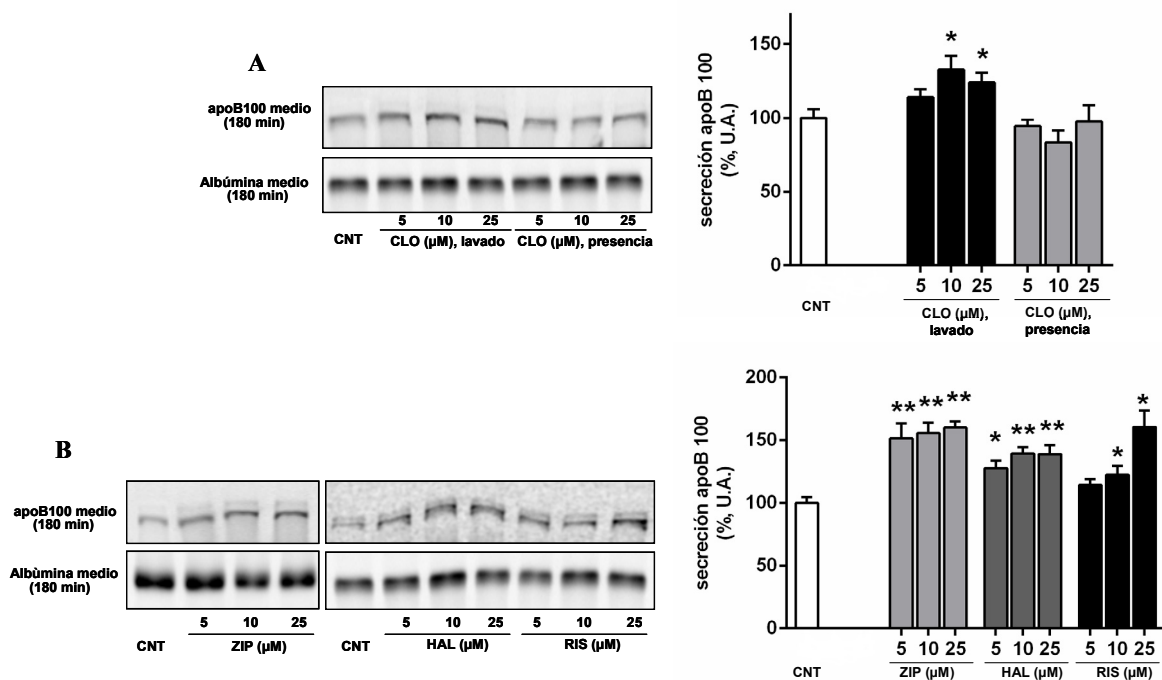


**Figura 15. Efecto del inhibidor de MTP sobre la secreción de apoB100 en células HepG2.**

Las células se trataron con el inhibidor de MTP, CP-346086 a 10  $\mu$ M durante 20 h o se dejaron sin tratar (control). Tras ese periodo las células se cambiaron de medio y se les puso durante 1 h en medio sin metionina y en presencia del inhibidor. Después se añadió al medio [<sup>35</sup>S]-metionina y al cabo de 15 minutos se retiró el medio y se puso medio con metionina fría en presencia del inhibidor. Al final se recogió el medio y se utilizó para realizar una inmunoprecipitación con anti-apoB y con anti-albúmina como proteína control. Se resolvió el inmunoprecipitado mediante SDS-PAGE y se detectó la radioactividad usando un Typhoon 9400 PhosphorImager. Se muestra el resultado de un experimento representativo.

Para analizar que el efecto de los antipsicóticos sobre la síntesis y secreción de apoB, a continuación realizamos un experimento para determinar el efecto de la presencia continuada de antipsicóticos en comparación con el lavado. Para ello elegimos la clozapina, debido a su potente efecto en la síntesis de lípidos. Las células se trataron con diferentes dosis del fármaco (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ) durante 20 horas. Un grupo de células se mantuvo en presencia del fármaco y otro se pasó a un medio sin clozapina para analizar el efecto durante el periodo de lavado. En ambos casos, se marcaron metabólicamente con [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina. En las células expuestas continuamente a la clozapina, no se encontraron diferencias significativas en la secreción de apoB, con respecto al control (**Figura 16A**). En cambio, cuando se midió la secreción de apoB en el periodo de lavado observamos un incremento significativo con las dosis más altas de clozapina utilizadas. Por el contrario, la secreción de albúmina, elegida como control, no se vio afectada en ningún caso (**Figura 16A**).

Una vez demostrado que sólo durante el periodo de lavado, la clozapina incrementaba la secreción de apoB, decidimos comprobar qué ocurría durante este periodo con los otros antipsicóticos. Como se puede apreciar en la **figura 16B**, el haloperidol y la ziprasidona aumentaron significativamente la secreción de apoB al medio cualquier dosis (5, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ), mientras que la risperidona sólo produjo un incremento significativo con las dos dosis más altas (**Figura 16B**).



**Figura 16. Efecto de los antipsicóticos en la secreción de apoB-100 en células HepG2.** Las células se trataron con los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) durante 20 h o se dejaron sin tratar (control). Tras ese periodo las células se cambiaron de medio y se les puso durante 1 h en medio sin metionina y en presencia o ausencia de antipsicóticos. Después se añadió al medio [<sup>35</sup>S]-metionina y al cabo de 15 minutos se retiró el medio y se puso medio con metionina fría en exceso y en presencia o ausencia de los antipsicóticos. Al final se recogió el medio y se utilizó para realizar una inmunoprecipitación con anti-apoB y con anti-albúmina como proteína control. Se resolvió el inmunoprecipitado mediante SDS-PAGE y se detectó la radioactividad usando un Typhoon 9400 PhosphorImager. A: Efecto de la clozapina (5, 10 y 25 μM) sobre la secreción de apoB100 al medio en presencia del antipsicótico o en ausencia (lavado). B: Efecto de la ziprasidona, haloperidol y risperidona (5, 10 y 25 μM) sobre la secreción de apoB-100 después de retirar las drogas del medio (lavado). Se muestra el resultado de un experimento representativo. El diagrama de barras muestra el análisis de las bandas por densitometría (U.A., unidades arbitrarias) expresado en tanto por ciento con respecto al control (media ± EE, n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de una vía, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Las diferencias estadísticas se muestran frente al control (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01). CLO, clozapina; HAL, haloperidol; RIS, risperidona; ZIP, ziprasidona.



### 7. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA INHIBICIÓN DEL TRÁFICO DEL COLESTEROL DE LAS LDL PRODUCIDA POR LOS ANTIPSICÓTICOS

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que los antipsicóticos, tanto de FGA como de SGA, producen una inhibición del tráfico de colesterol de las LDL a nivel del compartimento endo-lisosomal. Ha sido descrito por otros autores que la curcumina, el polifenol activo mayoritario del rizoma de la *Curcuma longa*, desbloquea el tráfico del colesterol de las LDL en la deficiencia de NPC1, mejorando el fenotipo celular (Lloyd-Evans et al., 2008). Con estos antecedentes, decidimos investigar si la curcumina podría aliviar el fenotipo producido por los antipsicóticos *in vitro*. Previamente había sido descrito que la curcumina aliviaba la acumulación de colesterol en los endo-lisomas en las células tratadas con U18666A (Lloyd-Evans et al., 2008), por lo que nosotros hemos usado este agente como control del efecto de la curcumina sobre este bloqueo del tráfico. Para ello, incubamos las células HepG2 con DiI-LDL, en presencia de los antipsicóticos a 10  $\mu\text{M}$  o de U18666A a 5  $\mu\text{M}$  o en ausencia de los fármacos en el caso del control, durante 24 horas. Dos horas antes del final de la incubación se añadió curcumina 30  $\mu\text{M}$ , tras lo cual las células se fijaron, se tiñeron con filipina (colesterol libre) y con anti-CD63 (lisosoma), para analizarlas por microscopía confocal.

Como ya hemos descrito en el Apartado 3, las células tratadas con cualquiera de los antipsicóticos utilizados presentan un incremento en el marcaje de filipina que es perinuclear, positivo para CD63 y que colocaliza con DiI, lo cual indica una acumulación de colesterol libre, procedente de las LDL en los endo-lisomas (**Figura 17**). Lo mismo tiene lugar en el caso de las células tratadas con U18666A. En contraste, las células tratadas posteriormente con curcumina, presentan una disminución en el tamaño de los gránulos positivos para CD63, filipina y DiI; además, se observan numerosos gránulos marcados con DiI y filipina en zonas más periféricas de la célula (**Figura 17**).

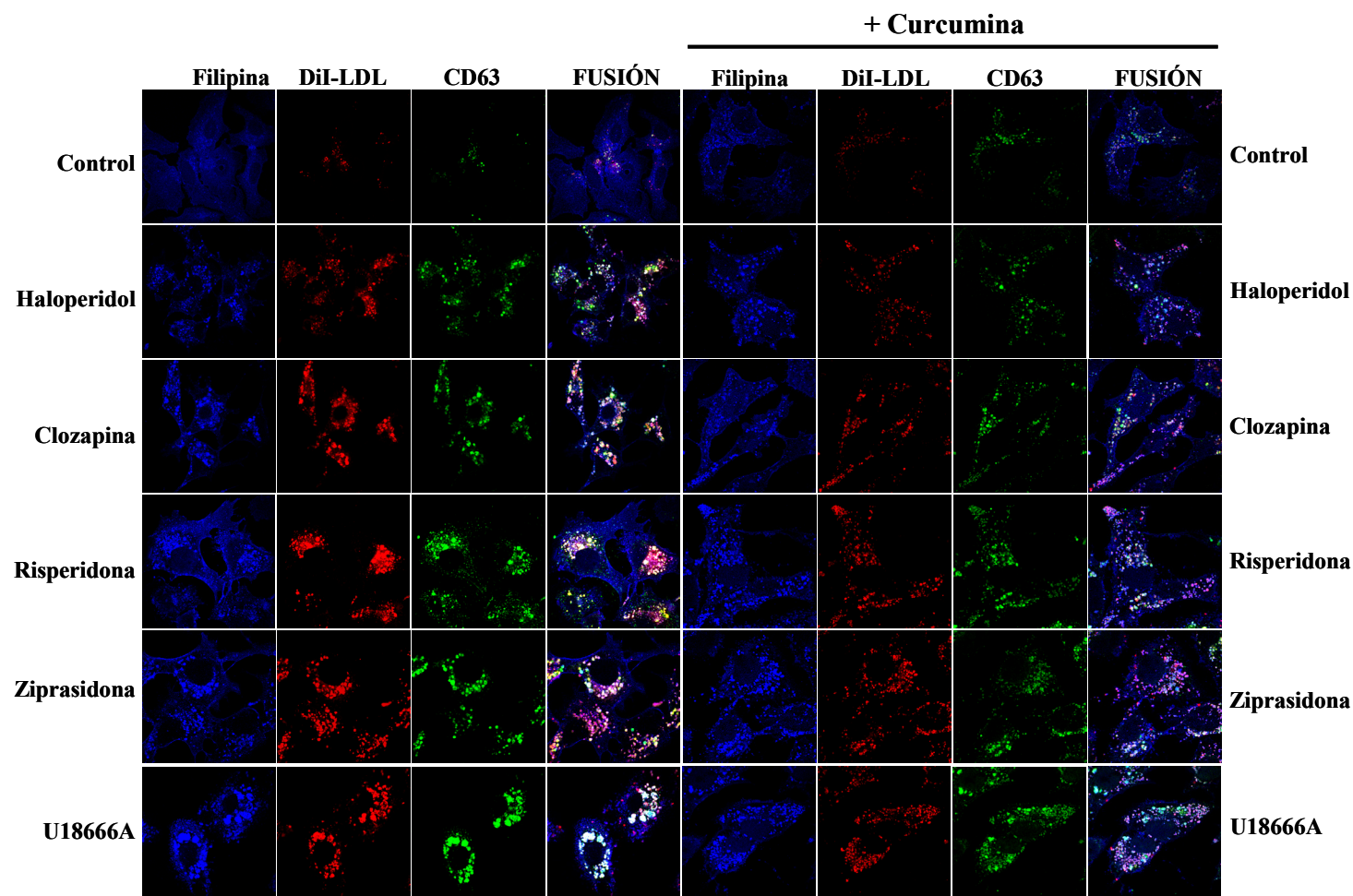
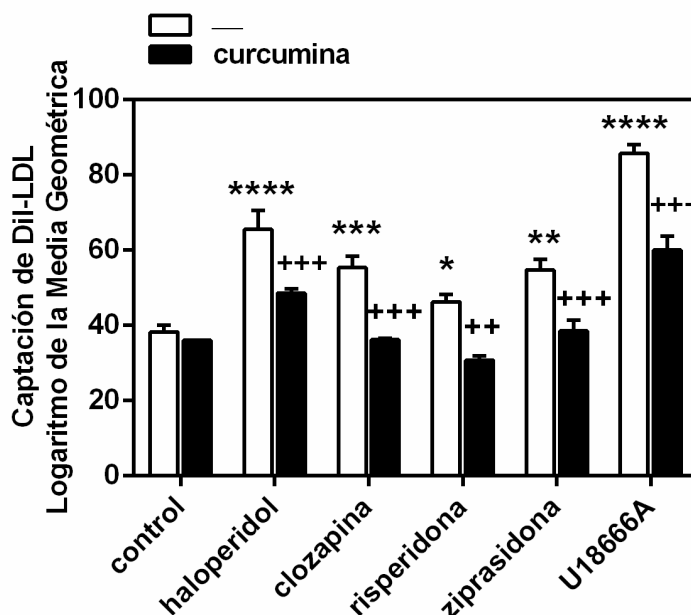


Figura 17. Efecto de la curcumina sobre la acumulación de LDL en los endo-lisosomas inducida por los antipsicóticos. Las células HepG2 sin tratar (control) o tratadas con haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona 10  $\mu$ M o U18666A 5  $\mu$ M fueron incubadas en presencia de DiI-LDL (30  $\mu$ g/ml de colesterol) durante 24 h y las 2 últimas con o sin curcumina 30  $\mu$ M. Al final de la incubación las células se fijaron y se tiñeron con filipina y CD63, posteriormente se fotografiaron usando un microscopio confocal. Los resultados que se muestran son representativos de tres experimento independientes.

Por citometría de flujo cuantificamos el depósito intracelular de DiI-LDL. Como se muestra en la **figura 18**, la curcumina disminuye el contenido de DiI, especialmente en las células tratadas con los antipsicóticos, lo cual confirma que este polifenol alivia la inhibición del tráfico de colesterol-LDL producida por los antipsicóticos.



**Figura 18. Efecto de la curcumina sobre la acumulación intracelular de DiI-LDL inducida por los antipsicóticos.** Las células HepG2 fueron expuestas a DiI-LDL (60  $\mu\text{g/ml}$  de colesterol) durante 22 h en ausencia (control) o presencia de los antipsicóticos (10  $\mu\text{M}$ ). Tras la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células y se añadió medio sin suero bovino fetal, suplementado con los distintos fármacos o con el vehículo (control), en ausencia o en presencia de curcumina 30  $\mu\text{M}$ . Tras 2 h, las células se recogieron para determinar por citometría de flujo la cantidad de DiI-LDL en el interior celular. Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. La comparación estadística se realizó enfrentando cada antipsicótico con su homólogo del grupo curcuminael control (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ ) o cada antipsicótico con su homólogo del grupo curcumina (+  $p<0.05$ , ++  $p<0.01$ , +++  $p<0.001$ ).

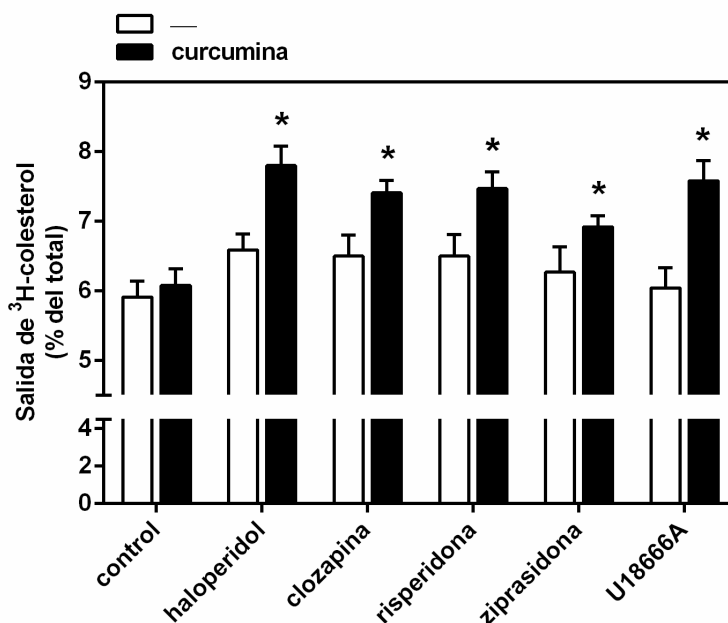
### 8. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA SECRECIÓN DE COLESTEROL

A continuación quisimos estudiar si el tratamiento con curcumina tenía algún efecto sobre el colesterol acumulado en el compartimento endo-lisosomal. Para ello, las células HepG2, tratadas o no (control) con los distintos antipsicóticos a 10  $\mu$ M o U18666A a 5  $\mu$ M, se incubaron en medio con LPDS suplementado con LDL marcadas con  $^3$ H-colesterol, durante 22 horas. Trascurrido este tiempo, el medio se retiró, se lavaron las células y se añadió medio nuevo sin suero, con los distintos antipsicóticos o U18666A y curcumina 30  $\mu$ M, dejándose incubar durante 2 horas más. Al final se recogió el medio de cultivo para cuantificar la salida de  $^3$ H-colesterol al medio extracelular y se lisaron las células, para poder expresar los resultados como porcentaje de  $^3$ H-colesterol en el medio respecto al total. Como puede observarse en la **figura 19**, la curcumina promovió la salida al exterior del colesterol de la célula, de forma significativa cuando éstas habían sido tratadas con los antipsicóticos o con U18666A. Dado que los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de aceptores de colesterol, como por ejemplo apoAI, los resultados sugieren que la curcumina promueve la salida de colesterol a través de una vía alternativa que no es la clásica mediada por ABCA1.

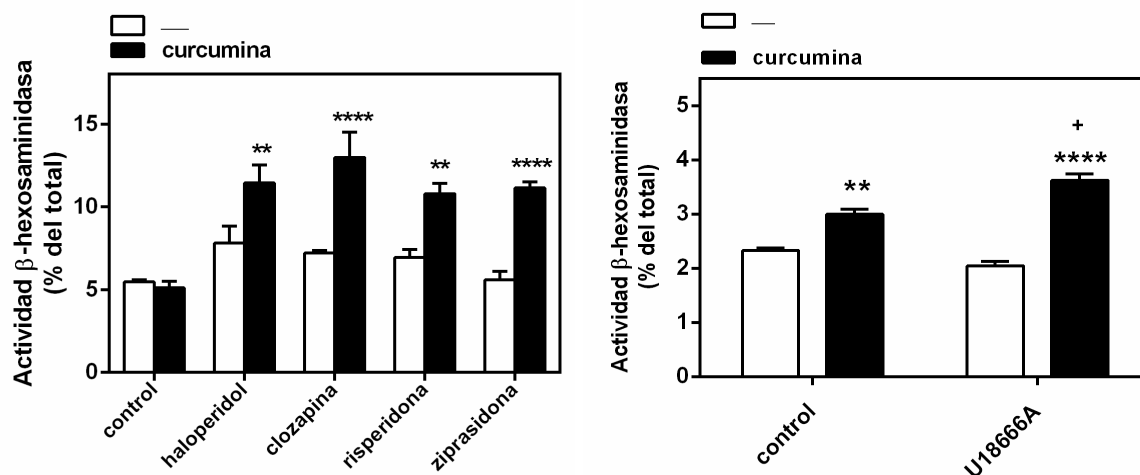
### 9. LA CURCUMINA PROMUEVE LA SECRECIÓN DE EXOSOMAS

A la vista de los resultados anteriores, quisimos analizar si estos efectos de la curcumina se debían a la secreción de exosomas. Los exosomas son vesículas que se generan en el lumen de los endosomas/lisomas y se liberan al medio extracelular al fusionarse los MVB con la membrana plasmática (ver Apartado 5.1 de la Introducción). Para determinar si la curcumina inducía la salida de exosomas, se analizaron diferentes parámetros en el medio de cultivo. Las células HepG2 en medio con LPDS se expusieron a LDL (60  $\mu$ g/ml de colesterol) en ausencia (control) o presencia de los distintos antipsicóticos a 10  $\mu$ M o U18666A a 5  $\mu$ M durante 22 horas. Después, se retiró el medio, se lavaron las células dos veces con PBS, y se añadió medio nuevo sin suero, suplementado o no (control) con los antipsicóticos o U18666A, y la incubación continuó durante 2 horas más en ausencia o en presencia de 30  $\mu$ M curcumina. En primer lugar, medimos la actividad de  $\beta$ -hexosaminidasa, una enzima lisosomal que se emplea como marcador de secreción del contenido del endo-lisosoma al medio extracelular (Griffiths et al., 1990). Como se muestra en la **figura 20**, el tratamiento con

curcumina incrementó significativamente la actividad de la  $\beta$ -hexaminidasa en el medio de cultivo, lo que sugiere que aquel polifenol promueve la salida del contenido del endo-lisosoma al exterior celular. Este efecto fue particularmente intenso en las células tratadas con los antipsicóticos o el U18666A.

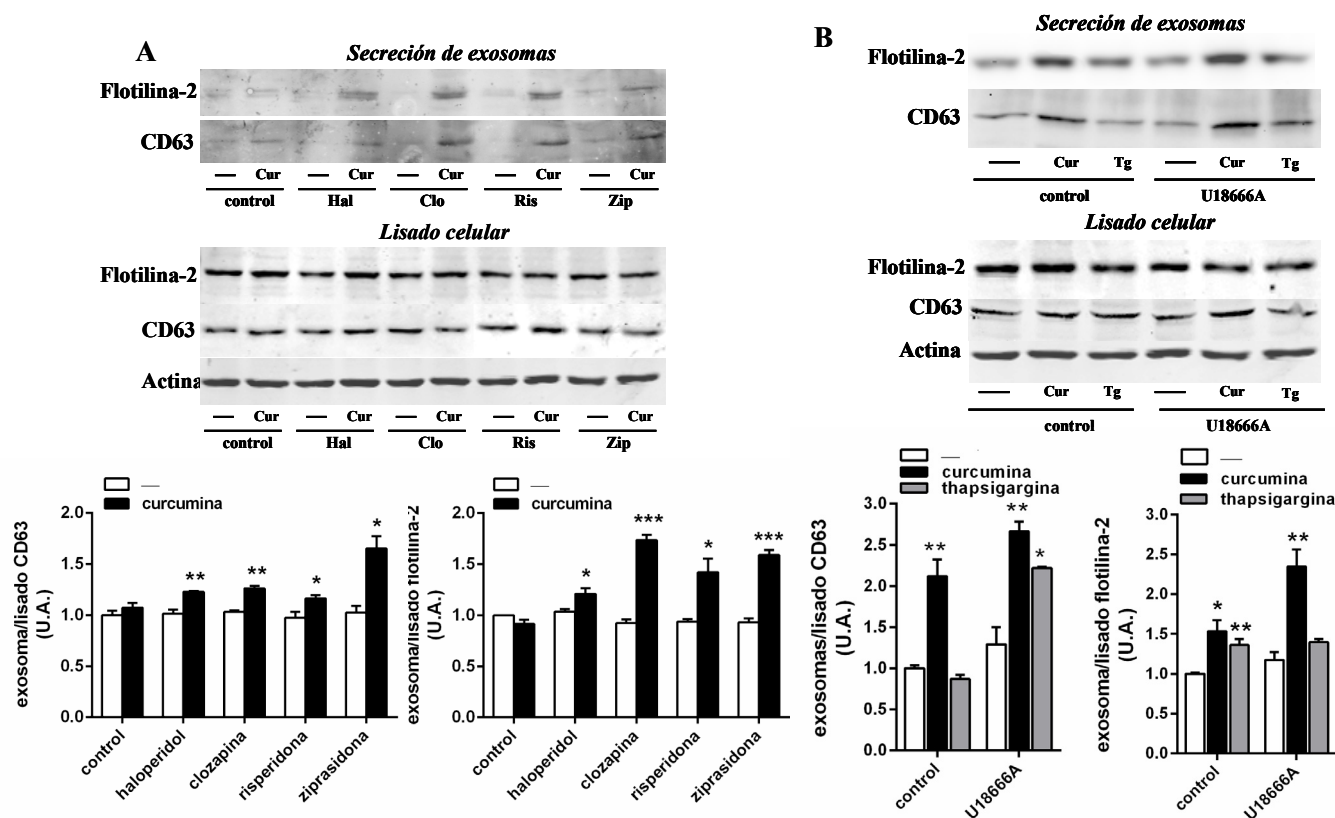


**Figura 19. Efecto de la curcumina sobre la salida de colesterol derivado de LDL en células HepG2 tratadas con los antipsicóticos o con vehículo (control).** Las células fueron expuestas a LDL (60  $\mu$ g/ml de colesterol) marcadas con [ $^3$ H]-colesterol durante 22 h en ausencia (control) o presencia de los antipsicóticos (10  $\mu$ M). Como control positivo de la acumulación de colesterol derivado de LDL en los endo-lisosomas, se utilizó U18666A 5  $\mu$ M. Tras la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células y se añadió medio sin suero bovino fetal, suplementado con los distintos fármacos o con el vehículo (control), en ausencia o en presencia de curcumina 30  $\mu$ M. Tras 2 h se recogieron el medio y las células para medir la radioactividad. La salida de colesterol radiactivo se expresa como porcentaje del colesterol radioactivo total (medio + células). Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. La comparación estadística se realizó enfrentando cada antipsicótico con su homólogo del grupo curcumina (\*  $p < 0.05$ ).



**Figura 20. Efecto de la curcumina sobre la secreción de  $\beta$ -hexosaminidasa hacia el medio de cultivo, en células tratadas con los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona) (A) o con U18666A (B).** Las células fueron expuestas a LDL (60  $\mu$ g/ml de colesterol), durante 22 h en ausencia (control) o presencia de los antipsicóticos (10  $\mu$ M) o U18666A (5  $\mu$ M). Tras la incubación, se retiró el medio, se lavaron las células y se añadió medio sin suero bovino fetal, suplementado con los distintos fármacos o con el vehículo (control), en ausencia o en presencia de curcumina 30  $\mu$ M. Tras 2 h se recogieron el medio y las células para medir la actividad enzimática. La actividad enzimática en el medio se expresa como porcentaje de la actividad enzimática total (medio + células). Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Las comparaciones estadística que se muestran se realizaron enfrentando cada tratamiento con su homólogo del grupo curcumina (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ) o el control y curcumina contra U18666A y curcumina ( $^+$   $p < 0.05$ ).

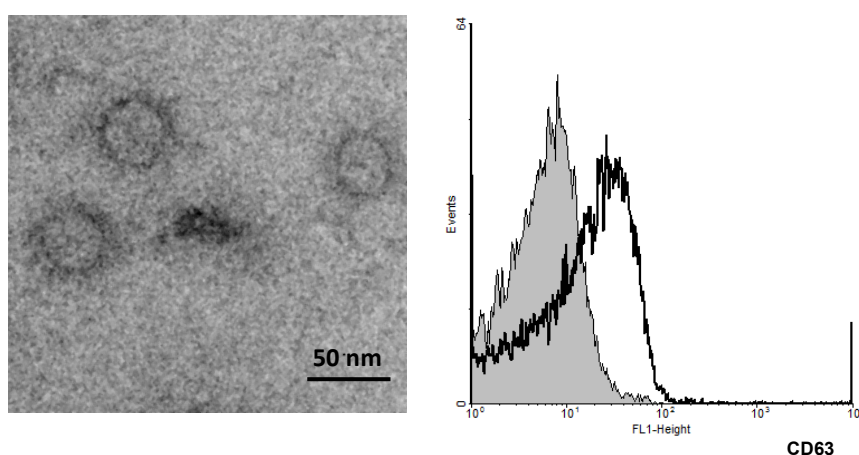
Para caracterizar mejor si el efecto de la curcumina inducía la salida de exosomas, decidimos aislarlos del medio de cultivo utilizando el método descrito por They y colaboradores (They et al., 2006), y detectar mediante western-blot la presencia de proteínas que han sido descritas como marcadores de exosomas, como la flotilina-2 y la CD63 (Conde-Vancells et al., 2008; Chen et al., 2010; Strauss et al., 2010; Mathivanan et al., 2012). También se analizó la presencia de estas proteínas en el lisado celular. En el caso del U18666A, los resultados del efecto de la curcumina sobre el bloqueo del tráfico se compararon con los de la taspigargina, de la cual se conoce su capacidad para estimular la secreción de exosomas (Savina et al., 2003). Tal y como se muestra en la **figura 21**, en las células expuestas a los antipsicóticos o al U18666A, el tratamiento con curcumina incrementó la presencia de flotilina-2



**Figura 21. Efecto de la curcumina sobre la secreción de flotilina-2 y de CD63 en forma de exosomas, en células HepG2.** Las células se expusieron a LDL (60 µg/ml de colesterol) en ausencia (control) o presencia de antipsicóticos (10 µM) (A) o de U18666A 5 µM (B) durante un total de 24 h. A continuación, las células se lavaron y se pusieron en medio sin suero en ausencia (control) o presencia de los antipsicóticos y se añadió curcumina 30 µM durante las últimas 2 h. Al finalizar la incubación se recogió el medio, se aislaron los exosomas y se analizaron por *western-blot*. Las células también se recogieron y se analizaron por *western-blot*. Los resultados que se muestran son representativos de tres experimentos independientes. El diagrama de barras muestra el análisis de las bandas por densitometría (U.A., unidades arbitrarias) expresado en tanto por uno con respecto al control (media ± EE, n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Las diferencias estadísticas que se muestran son entre cada tratamiento y su homólogo con curcumina (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Hal, haloperidol; Clo, clozapina; Ris, risperidona; Zip, Ziprasidona; Cur, curcumina.

y de CD63 en la fracción de exosomas, mientras que no se apreciaron cambios en el contenido de estas proteínas en el lisado celular.

Para confirmar que las estructuras aisladas eran exosomas, decidimos examinar las preparaciones mediante microscopía electrónica (**Figura 22A**). El análisis reveló la presencia de unas estructuras redondeadas de un tamaño aproximado de entre 50 y 100 nm, similar a lo descrito para los exosomas (Valadi et al., 2007; Strauss et al., 2010; Record et al., 2011).



**Figura 22. Identificación y caracterización de los exosomas.** Los exosomas fueron aislados del medio de cultivo de células HepG2 mediante repetidas centrifugaciones y ultracentrifugaciones. (A) Micrografía electrónica de exosomas aislados. La imagen muestra pequeñas vesículas de unos 50-80 nm de diámetro. (B) Análisis por citometría de flujo de los exosomas aislados. Para ello, los exosomas se unieron a microesferas de látex y se marcaron con CD63 (curva sin relleno). La curva con relleno corresponde a un control negativo.

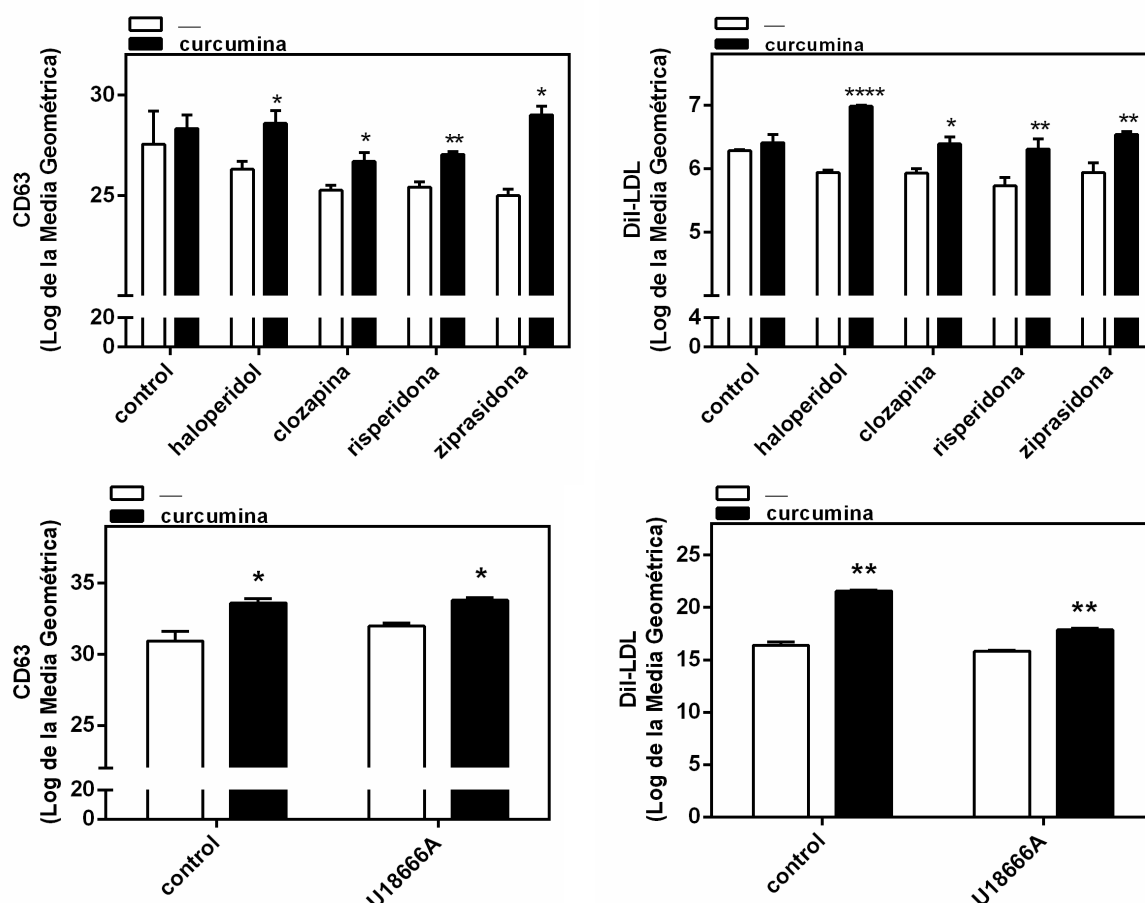
Los exosomas son demasiado pequeños como para ser analizados por citometría de flujo directamente. Para solventarlo, los exosomas aislados se fijaron a microesferas de látex (Thery et al., 2006). Usando un anticuerpo frente a CD63, confirmamos que las partículas unidas a las microesferas de látex eran exosomas (**Figura 22B**).

Después cuantificamos mediante citometría de flujo la cantidad de CD63 y DiI de los exosomas unidos a las microesferas de látex. En la **figura 23** se muestra como la incubación con curcumina en las células tratadas previamente con los antipsicóticos o con U18666A, incrementa significativamente la cantidad de CD63 y DiI vehiculizada en exosomas.



## Resultados

En conjunto, todos estos resultados muestran que la curcumina promueve la secreción de exosomas, lo cual constituye una vía alternativa para la salida del colesterol acumulado en el compartimento endo-lisosomal por efecto de los antipsicóticos o de otras aminos anfipáticas, como el U18666A, que alivia el fenotipo de depósito intracelular de lípidos provocado por estos fármacos.



**Figura 23. Efecto de la curcumina sobre la secreción de exosomas mediante análisis de su contenido de CD63 y de DiI-LDL por citometría de flujo.** Las células HepG2 se expusieron a LDL (60  $\mu\text{g/ml}$  de colesterol) en ausencia (control) o presencia de antipsicóticos (10  $\mu\text{M}$ ) (A) o de U18666A 5  $\mu\text{M}$  (B) durante un total de 24 h. A continuación, las células se lavaron y se pusieron en medio sin suero en ausencia (control) o presencia de los fármacos y se añadió curcumina 30  $\mu\text{M}$  durante las últimas 2 h. Al finalizar la incubación se recogió el medio y se aislaron los exosomas, los cuales fueron incubados con microesferas de látex, se marcaron con CD63 y se analizaron por citometría de flujo. Las gráficas representan la fluorescencia de CD63 y de DiI-LDL en los exosomas. Los resultados muestran la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Las diferencias estadísticas se muestran entre cada fármaco frente a su homólogo con curcumina (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

### 10. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS

Nuestros resultados y los publicados por otros autores muestran que los antipsicóticos, tanto los FGA como los SGA, estimulan la expresión de *SREBF2*, y de sus genes diana *HMGR* y *LDLR* (Ferno et al., 2005; Ferno et al., 2006; Ferno et al., 2009; Kristiana et al., 2010; Laressergues et al., 2010; Laressergues et al., 2011). Por otra parte, hemos observado que la curcumina disminuye la cantidad de colesterol acumulado en el compartimento endo-lisosomal producido por los antipsicóticos. Por todo ello, nos propusimos comprobar si la curcumina afectaba la expresión de los genes anteriormente citados, en correspondencia con la mejora del fenotipo. Para ello, las células HepG2 se trataron con los antipsicóticos a 10  $\mu$ M durante un total de 6 horas, las 2 últimas en presencia de curcumina o en su ausencia (control) y se midió la expresión de aquellos genes. En ausencia de curcumina, todos los antipsicóticos (haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona), incrementaron los niveles de ARNm de *SREBF2*, *HMGR* y *LDLR* con respecto al control (**Tabla 9**). La adición de curcumina al medio de incubación produjo un fuerte descenso en la expresión de estos genes, especialmente en las células tratadas con los antipsicóticos, lo que confirma que la curcumina ayuda a restablecer la homeostasis lipídica intracelular.

	Control	Haloperidol	Clozapina	Risperidona	Ziprasidona
<b><i>SREBF2</i></b>					
- curcumina	1.000±0.062	1.201±0.032*	1.724±0.143****	1.481±0.078**	1.468±0.094**
+ curcumina	0.596±0.091 <sup>+</sup>	0.853±0.084 <sup>+</sup>	1.186±0.040 <sup>+++</sup>	1.159±0.058	1.131±0.076 <sup>+</sup>
<b><i>HMGR</i></b>					
- curcumina	1.000±0.026	1.376±0.105*	2.698±0.142****	1.172±0.075*	1.870±0.159****
+ curcumina	0.579±0.032 <sup>+</sup>	0.774±0.055 <sup>+++</sup>	1.435±0.076 <sup>++++</sup>	0.615±0.041 <sup>+++</sup>	1.308±0.046 <sup>+++</sup>
<b><i>LDLR</i></b>					
- curcumina	1.000±0.041	1.195±0.055*	2.061±0.140****	1.191±0.053*	1.575±0.088***
+ curcumina	0.711±0.062 <sup>+</sup>	0.738±0.063 <sup>++</sup>	1.200±0.076 <sup>++++</sup>	0.687±0.047 <sup>+++</sup>	1.277±0.021 <sup>+</sup>

**Tabla 9. Efecto de la curcumina sobre la expresión de genes del metabolismo lipídico en células HepG2 tratadas o no con antipsicóticos.** Las células se preincubaron en medio con LPDS. Al tiempo 0, se les añadió LDL (30 µg/mL de colesterol) y los diferentes antipsicóticos o no (control) y las células se dejaron incubar durante 4 h, momento en el que se les retiró el medio, se repuso uno sin suero y sin LDL pero con los antipsicóticos o el vehículo (control) y, en su caso, curcumina 30 µM. En estas condiciones se dejaron incubar otras 2 h. Al final, se recogieron las células, se extrajo el ARN y las especies se cuantificaron mediante RT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión del ARNm de Rplp0. Los datos se expresan como la media ± EE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante test ANOVA de dos vías para los factores antipsicótico y curcumina, posteriormente se realizó un test de Bonferroni. Las comparaciones estadísticas son frente al control (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) o bien frente a la condición sin curcumina (<sup>+</sup>  $p < 0.05$ , <sup>++</sup>  $p < 0.01$ , <sup>+++</sup>  $p < 0.001$ , <sup>++++</sup>  $p < 0.0001$ ).



*Discusión*

---



## DISCUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado el efecto de los antipsicóticos sobre diferentes aspectos de la homeostasis intracelular de lípidos y de la secreción de los mismos. Estos neurolépticos son ampliamente utilizados para el tratamiento de la esquizofrenia y otras enfermedades mentales, pero no están libres de efectos metabólicos adversos, como el incremento de peso, la hipertrigliceridemia y la hiperglucemia. Dentro de este marco, determinar el efecto de los antipsicóticos sobre el metabolismo de lípidos, el tráfico intracelular del colesterol o la secreción de lípidos, puede contribuir a entender las consecuencias del tratamiento con antipsicóticos sobre la fisiología celular. Además, hemos estudiado los efectos beneficiosos de la curcumina, un polifenol ampliamente usado en cocina, sobre los efectos metabólicos de los antipsicóticos, aportando un nuevo agente terapéutico seguro y de fácil obtención, que puede aliviar los efectos no deseados de los antipsicóticos.

### **1. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA COLESTEROGÉNESIS**

La pionera observación de Summerly y Yardley (Summerly and Yardley, 1965), demostrando que la administración de haloperidol reducía la incorporación de acetato radioactivo a colesterol en la piel de las ratas, retomó interés con la aparición de los antipsicóticos de segunda generación (SGA), los cuales presentan menos efectos piramidales que los anteriores pero no están libres de los efectos adversos de tipo metabólico. Se han publicado recientemente algunos estudios con resultados aparentemente contradictorios en relación al efecto de los antipsicóticos sobre la biosíntesis de colesterol. Así, algunos reportan que determinados antipsicóticos inhiben la biosíntesis de colesterol en células *in vitro* (Sánchez-Wandelmer et al., 2009a; Kristiana et al., 2010; Sánchez-Wandelmer et al., 2010), mientras que otros observan lo contrario (Laouressergues et al., 2010). En el presente trabajo demostramos que los antipsicóticos, tanto de FGA (haloperidol) como de SGA (clozapina, risperidona y ziprasidona), inhiben la biosíntesis de colesterol, lo que se traduce en un cambio en la composición de esteroides de las células y la activación del factor de transcripción

SREBP-2 que promueve la expresión de múltiples genes implicados en el metabolismo lipídico.

Usando distintos modelos celulares, hemos observado que los antipsicóticos, a concentraciones que pueden considerarse terapéuticamente relevantes (5  $\mu$ M), reducen intensamente la incorporación de acetato radioactivo a colesterol, al tiempo que incrementan la concentración de determinados esteroides precursores del colesterol, sustratos de las enzimas inhibidas. La composición de esteroides se analizó tanto mediante HPLC/UV como por CG/EM. Los efectos observados variaron según el antipsicótico y la concentración empleada. Basándonos en los cambios en la radiactividad incorporada y en la concentración de los distintos esteroides, hemos descifrado las enzimas de la biosíntesis del colesterol afectadas por los distintos antipsicóticos. En la línea celular de hepatoma humano HepG2, la clozapina afecta principalmente las actividades  $\Delta^{24}$ -reductasa y  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa, la risperidona afecta las actividades  $\Delta^7$ -reductasa y  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa, y la ziprasidona y el haloperidol afectan la  $\Delta^7$ -reductasa y la  $\Delta^{14}$ -reductasa. En los promielocitos humanos HL-60 y en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, los efectos producidos por los antipsicóticos fueron muy parecidos a los observados en las HepG2, aunque con algunas pequeñas diferencias. El efecto de la clozapina sobre la  $\Delta^{24}$ -reductasa y la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa fue menos intenso y, consecuentemente también sobre la biosíntesis de colesterol. La risperidona inhibió la actividad  $\Delta^7$ -reductasa y, con menor intensidad, la  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la  $\Delta^{14}$ -reductasa. El haloperidol y la ziprasidona inhibieron fuertemente las actividades  $\Delta^{14}$ -reductasa,  $\Delta^7$ -reductasa y  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa.

Estos resultados señalan que la risperidona y la ziprasidona, dos SGA, y el haloperidol, FGA, afectan las mismas actividades enzimáticas, en el siguiente orden:  $\Delta^7$ -reductasa >  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa =  $\Delta^5$ -desaturasa >  $\Delta^{14}$ -reductasa, siendo su potencia relativa: ziprasidona > haloperidol > risperidona. Por otro lado, la clozapina (otro SGA), produjo la acumulación de esteroides insaturados (desmosterol, 7,24-colestadienol y zimosterol) preferentemente, lo que es indicativo de una inhibición de la actividad  $\Delta^{24}$ -reductasa, aunque en menor medida también inhibió la actividad  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa.

Al comparar los resultados obtenidos en los distintos tipos celulares hemos encontrado algunas diferencias que merecen atención. En la condición control, las células HepG2 y las SH-SY5Y tienen un alto contenido de colesterol (36-37  $\mu$ g/mg de proteína celular) en comparación con las HL-60 (11  $\mu$ g/mg de proteína celular). En



cuanto a otros esteroides, las células HL-60 y SH-SY5Y contienen cantidades apreciables de 7DHC, mientras que en la línea celular HepG2 apenas se detecta este intermediario pero contienen desmosterol. Estos perfiles sugieren que la actividad  $\Delta^7$ -reductasa puede ser limitante en las HL-60 y las SH-SY5Y pero no en las HepG2, donde parece serlo la  $\Delta^{24}$ -reductasa. Como hemos visto, el tratamiento con los antipsicóticos (salvo la clozapina) inhibió en todos los casos la actividad  $\Delta^7$ -reductasa, pero los niveles de 7DHC alcanzados difirieron entre las distintas líneas celulares. Por ejemplo, con haloperidol 5  $\mu$ M, las células HL-60 y SH-SY5Y acumularon entre 12-14  $\mu$ g de 7DHC por mg de proteína celular, mientras que las HepG2 sólo 1  $\mu$ g/mg. En las células HL-60 concretamente, la disminución a la mitad de la producción de colesterol por efecto del haloperidol se vio más que compensada por la acumulación de 7DHC, de modo que la cantidad total de esteroides superaba incluso la detectada en la condición control. Esto significa que la biosíntesis de esteroides en su conjunto no se vio inhibida por efecto del haloperidol. Una situación similar se observa con la ziprasidona y la risperidona cuando se computan todos los intermediarios. En las células HepG2, también se produjo un claro descenso del colesterol intracelular por efecto de aquellos antipsicóticos pero la cantidad de esteroides intermediarios acumulados fue mucho menor, lo cual sugiere que en respuesta a los antipsicóticos se produce una inhibición en algún paso más proximal en esta vía metabólica (probablemente a nivel de la HMG-CoA reductasa), reduciéndose el flujo de carbonos hacia esteroides. Una situación intermedia se encontró en las células SH-SY5Y. Estos resultados demuestran que las enzimas objeto de inhibición por efecto de los antipsicóticos son las mismas en los distintos tipos celulares y las consecuencias en la reducción del contenido celular de colesterol son similares en términos absolutos, pero la acumulación de esteroides intermediarios y, por lo tanto, el contenido total de esteroides varía entre las diferentes líneas celulares, probablemente como consecuencia de la distinta intensidad de la respuesta reguladora que se desencadena ante la presencia de los antipsicóticos.

Los resultados que se encuentran en la bibliografía sobre el efecto de los antipsicóticos en la biosíntesis de colesterol son dispares. Silve y colaboradores demostraron que el haloperidol se unía a EBP (*emopamil binding protein*) e inhibía la actividad  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa en levaduras (Silve et al., 1996). Kelly y Hennekam observaron un incremento de la concentración plasmática de 7DHC en pacientes tratados con haloperidol, y propusieron que este antipsicótico inhibía la actividad  $\Delta^7$ -reductasa

(Kelley and Hennekam, 2000). Nuestro grupo de investigación reportó que el haloperidol inhibía la biosíntesis de colesterol provocando un descenso en el colesterol celular y la acumulación de diferentes esteroides intermediarios (7DHC, zimostenol y colest-8,14-dien-3 $\beta$ -ol) dependiendo de la dosis empleada, sugiriendo la inhibición de las siguientes actividades enzimáticas en el orden:  $\Delta^7$ -reductasa >  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa >  $\Delta^{14}$ -reductasa (Sánchez-Wandelmer et al., 2009b; Sánchez-Wandelmer et al., 2010). Posteriormente, Kristiana y colaboradores confirmaron que el haloperidol y diversos SGA inhiben la biosíntesis de colesterol, aunque sin precisar las enzimas afectadas (Kristiana et al., 2010). Por el contrario, Laressergues y colaboradores, analizando la incorporación de acetato radioactivo a colesterol a las 4 horas tras retirar los antipsicóticos del medio de cultivo, observaron que el pretratamiento de hepatocitos de rata con clozapina, olanzapina (Laressergues et al., 2010) y risperidona (Laressergues et al., 2011) incrementaba, en vez de disminuir, la incorporación de acetato radioactivo a colesterol, mientras que con los antipsicóticos haloperidol, quetiapina y aripiprazol no observaron cambios significativos con respecto al control (Laressergues et al., 2010). Hay que señalar que estos últimos autores separaron los grandes grupos de lípidos mediante una cromatografía en capa fina que no permite distinguir los distintos esteroides, por lo tanto, sus resultados probablemente corresponden a esteroides totales más que a colesterol.

Debido a esta discrepancia, quisimos analizar la biosíntesis de colesterol tanto cuando las células se encontraban en presencia de los antipsicóticos como después de haber sido retirados del medio. Nuestros resultados muestran que tras el lavado de los antipsicóticos, en comparación a cuando el fármaco está presente en el medio, se produce una recuperación de la incorporación de acetato radiactivo a colesterol, que en algunos casos incluso llega a superar la observada en las células incubadas en condiciones controles, al tiempo que disminuye fuertemente la radioactividad presente en los esteroides intermediarios. Estos resultados reflejan que, según se diseñe el experimento y se analicen los esteroides, puede apreciarse una activación o una inhibición de la biosíntesis de colesterol por efecto de los antipsicóticos.

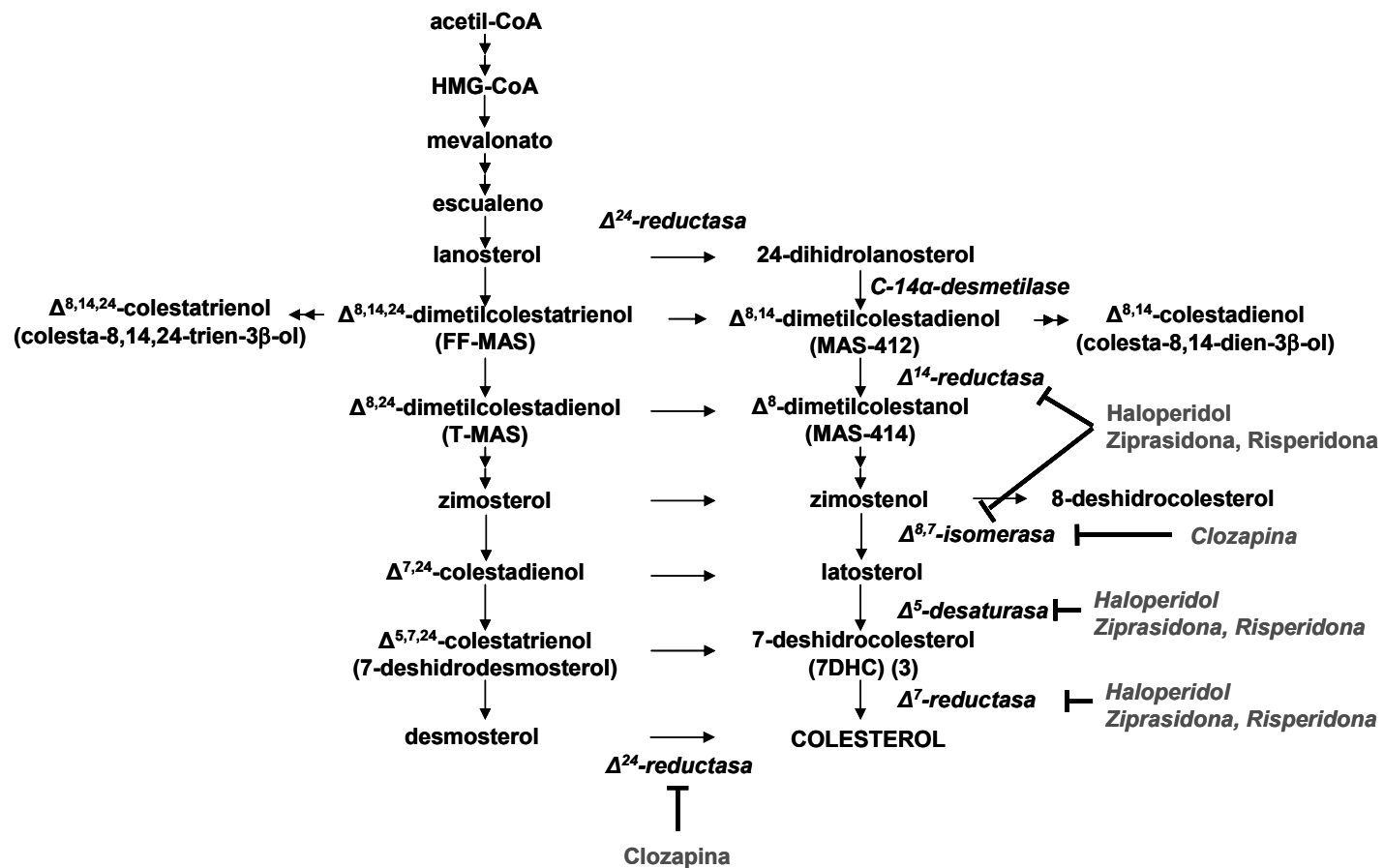


Figura 24. Resumen de la ruta de biosíntesis de colesterol donde se muestran los principales pasos que se ven inhibidos por los antipsicóticos de FGA, haloperidol y de SGA, clozapina, risperidona y ziprasidona.

La inhibición de la biosíntesis de colesterol junto con el bloqueo de la salida de colesterol del endo-lisosoma que se discutirá más adelante, deben contribuir a la observada activación de SREBP-2 por efecto de los antipsicóticos y la subsecuente sobreexpresión de sus genes diana, entre los que se incluyen ciertas enzimas que participan en la biosíntesis de colesterol (Ferno et al., 2005; Ferno et al., 2006; Polymeropoulos et al., 2009). El aumento en los niveles de las enzimas de la colesterogénesis que eventualmente debe tener lugar en respuesta a la activación de SREBP-2, sin embargo, estará contrarrestado por la acción inhibitoria de los antipsicóticos sobre dichas enzimas. Por lo tanto, mientras los antipsicóticos estén presentes en la célula, la biosíntesis de colesterol estará inhibida. Pero tras la retirada de los antipsicóticos, la biosíntesis de colesterol se recuperará o incluso puede llegar a ser superior que en la condición basal, por el incremento en la expresión de las enzimas y la desaparición de la inhibición directa sobre dichas enzimas. Aunque estos dos efectos son muy evidentes en nuestro modelo *in vitro*, son necesarios más estudios para determinar en qué medida se producen *in vivo*.

El mecanismo por el cual los antipsicóticos afectan a la actividad de estas enzimas de la biosíntesis de colesterol no se conoce. La aparente falta de selectividad en la acción del haloperidol, ziprasidona y risperidona, por cuanto inhiben distintas enzimas ( $\Delta^7$ -reductasa,  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y  $\Delta^{14}$ -reductasa) sugiere que estas enzimas tienen un mecanismo de acción similar o bien que estos antipsicóticos actúan sobre algún mecanismo muy general. De hecho, las enzimas que participan en la parte final de la biosíntesis de colesterol, parecen tener una gran afinidad por unirse a fármacos lipofílicos. El compuesto AY9944, que comparte con los antipsicóticos el hecho de ser una amina lipofílica, también inhibe aquellas enzimas y en el mismo orden de actividad (Tuck et al., 1991; Silve et al., 1996; Kelley and Hennekam, 2000; Horton et al., 2002; Fernández et al., 2005; Giera et al., 2007; Meex et al., 2011). Por lo tanto, es posible que los antipsicóticos mimeticen los intermediarios carbocatiónicos que están implicados en la actividad de esas enzimas, como lo hace el AY9944 (Rahier and Taton, 1996). En el caso de la clozapina, el mecanismo por el cual actúa sobre otras enzimas y las características estructurales que le atribuyen esta peculiaridad, se desconocen. Otra posibilidad es que los antipsicóticos ejerzan sus efectos por su capacidad de alterar las propiedades de las membranas. De hecho, se conoce que los antipsicóticos interaccionan con los lípidos de las membranas, con mayor afinidad por la

esfingomiélinea que por la fosfatidilcolina, lo que produce una alteración en las propiedades de las dobles capas lipídicas (Alves et al., 2011). Por otra parte, se ha demostrado que los antipsicóticos tienen la capacidad de intercalarse entre los fosfolípidos de las membranas, alterando su disposición espacial y compactándolos, lo cual afecta a las proteínas de la membrana (Oruch et al., 2008; Oruch et al., 2010). Esos datos pueden dar pie a especular que los antipsicóticos, tras intercalarse en las membranas del RE, pueden alterar la conformación y la función de las enzimas residentes, entre ellas algunas enzimas de la biosíntesis de colesterol. Todas estas posibilidades deben ser clarificadas mediante estudios biofísicos y bioquímicos más directos.

### **2. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE EL TRÁFICO INTRACELULAR**

Los antipsicóticos, al igual que otros compuestos de uso terapéutico común, como los agonistas de los receptores de estrógeno (tamoxifeno), los antidepresivos (imipramina, fluoxetina), los antiarrítmicos (amiodarona) o la cloroquina utilizada para el tratamiento de la malaria, estructuralmente son aminas anfipáticas que se caracterizan por poseer un anillo hidrofóbico y una cadena lateral hidrofílica con un grupo amino que puede ser protonado. Estos compuestos tienden a acumularse en los lisosomas por un mecanismo denominado retención de iones (Goldman et al., 2009). A pH fisiológico, estos compuestos no están ionizados y son capaces de difundir a través de las membranas de forma pasiva, pero a un pH ácido se ionizan lo que les impide atravesar las membranas, acumulándose en determinados orgánulos subcelulares como los lisosomas (Goldman et al., 2009). Muchas aminas anfipáticas que no son antipsicóticos, como el U18666A (Liscum and Faust, 1989), el AY9944 (Yoshikawa, 1991), el tamoxifeno (Suárez et al., 2004) o la amiodarona (Piccoli et al., 2011), provocan la acumulación de colesterol libre en los endo-lisosomas. Cabe destacar que alguno de ellos, además de inhibir el tráfico intracelular de las LDL también inhibe la actividad de enzimas de la biosíntesis de colesterol (Boogaard et al., 1987; Tuck et al., 1991; Fernández et al., 2005).

En este trabajo hemos demostrado en las células HepG2 que los antipsicóticos, tanto FGA como SGA, promueven la acumulación de colesterol libre procedente de las LDL en los endo-lisosomas. La acumulación de colesterol libre de las LDL endocitadas se produce en grandes vesículas perinucleares, que contienen LAMP2 y CD63,

marcadores de endo-lisomas. Estos resultados confirman observaciones previas de nuestro grupo de investigación referentes al haloperidol (FGA) (Sánchez-Wandelmer et al., 2010) y amplían las de otros autores con SGA (Kristiana et al., 2010). Además, nuestros resultados descartan que el bloqueo del tráfico provocado por los antipsicóticos afecte a las etapas tempranas de la endocitosis, ya que no se observan cambios en la distribución de marcadores de endosomas tempranos, como EEA1. Por lo tanto, podemos afirmar que los antipsicóticos FGA (haloperidol) y SGA (clozapina, risperidona y ziprasidona) provocan la acumulación de colesterol libre en los endosomas tardíos-lisomas (o endo-lisomas) sin afectar el compartimiento endocítico temprano.

Para profundizar en la caracterización de este bloqueo del tráfico intracelular, estudiamos la estructura juxtenuclear del complejo de Golgi, dada la comunicación existente entre ese complejo y el compartimento endosomal. Por otro lado, nos preguntamos si se depositaba colesterol libre procedente de las LDL también en el complejo de Golgi. Para ello analizamos mediante inmunocitoquímica el marcador de Golgi,  $\beta$ -COP, la filipina para colesterol libre y las LDL marcadas con DiI. Pudimos comprobar que los antipsicóticos no afectan la organización del complejo de Golgi y que tampoco se produce la acumulación de colesterol libre en ese complejo, por lo que, en principio, podemos concluir que los antipsicóticos no alteran la función del complejo de Golgi.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que ciertos antipsicóticos y antidepresivos se acumulan en los lisomas (Daniel and Wojcikowski, 1997; Daniel and Wojcikowski, 1999), lo cual hipotéticamente podría afectar la acción de las enzimas hidrolíticas lisosomales, conduciendo al depósito de lípidos en los endo-lisomas. Para explorar esta posibilidad, llevamos a cabo un estudio utilizando el DQ-BSA, un derivado de albúmina marcado pero que inicialmente no emite fluorescencia. Después de su unión a los receptores Fc, el complejo es internalizado y tras la hidrólisis de la proteína, emite fluorescencia. Ya que el complejo es internalizado mediante receptores Fc, nos vimos obligados a cambiar de modelo celular a uno donde se expresara dicho receptor, como son las células THP-1 diferentes a macrófagos. Los estudios de inmunocitoquímica demostraron que en presencia de los antipsicóticos las proteasas ácidas lisosomales son funcionales. Ciertamente es que son necesarios más experimentos para demostrar directamente que en presencia de los antipsicóticos

también la lipasa ácida es funcional, pero el hecho de que el contenido de colesterol libre en los endo-lisomas se incremente por efecto de las LDL, que transportan fundamentalmente ésteres de colesterol, también apunta a que la lipasa ácida lisosomal es funcional en las células tratadas con los antipsicóticos.

En otros trastornos del tráfico intracelular, ya sean inducidos por fármacos o se deban a defectos genéticos, se produce la acumulación en el endo-lisosoma de otros lípidos además de colesterol. Así, en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), al igual que en las células tratadas con U18666A, se produce la acumulación de esfingomiélin (Lloyd-Evans et al., 2008). La acumulación de esfingomiélin se ha relacionado con un retraso en la salida del colesterol de los lisomas. Se ha propuesto que esta retención del colesterol en presencia de esfingomiélin se debe a la formación de complejos entre ambos lípidos a modo de lo que ocurre en los dominios de membrana denominados *lipid rafts* (Walkley and Vanier, 2009). En este trabajo hemos demostrado que los antipsicóticos no producen cambios significativos en el contenido de esfingomiélin, pero sí se acumula LBPA, que es un fosfolípido que se localiza en la membrana luminal de los endo-lisomas. La acumulación de este lípido también se produce en células tratadas con amiodarona (Piccoli et al., 2011), un fármaco antiarrítmico con características de amina anfipática, que provoca un fenotipo en las células parecido al que observamos tras el tratamiento con los antipsicóticos. Al LBPA se le han atribuido dos funciones en el lisosoma: una reguladora de la dinámica de la membrana del lisosoma (invaginación de la membrana, formación de vesículas y fusión) (Frederick et al., 2009) y, la otra, la de favorecer la actividad hidrolítica facilitando la unión de las enzimas a las proteínas policationicas activadoras (Shayman and Abe, 2013). Por lo tanto, el incremento de la concentración de LBPA puede contribuir a los cambios en el catabolismo de lípidos que tienen lugar en el lisosoma por efecto de los antipsicóticos.

Resumiendo, los resultados obtenidos en este estudio sobre el tráfico intracelular ponen de manifiesto que los antipsicóticos no afectan la formación de endosomas tempranos ni la distribución del complejo de Golgi, aunque sí las últimas etapas de la vía endocítica, provocando la acumulación de colesterol libre procedente de las LDL en el compartimento endo-lisosomal así como la de LBPA. Estos efectos no parecen deberse a la inhibición de las enzimas hidrolíticas lisosomales y, a diferencia de lo que ocurre con otros agentes que inhiben el tráfico intracelular de colesterol, en el

caso de los antipsicóticos no se acumula esfingomiélin en los endo-lisomas. Todo ello permite sugerir que la causa del retraso en la salida del colesterol libre desde los endo-lisomas hacia el RE producida por los antipsicóticos, probablemente es la alteración de la permeabilidad de la membrana.

### **3. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

La homeostasis del colesterol está controlada por mecanismos de retroalimentación a través de los factores de transcripción SREBP, que se activan por la disminución de los niveles intracelulares de colesterol. Es bien conocida la relación inversa existente entre los niveles de colesterol en el RE y la activación de SREBP-2 en distintas situaciones fisiológicas y patológicas. Otros autores han descrito que determinados antipsicóticos incrementan la expresión de SREBP-2 y sus genes diana (Ferno et al., 2005; Ferno et al., 2006). Por ello esperábamos que en nuestro caso, como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis y del tráfico intracelular del colesterol, el tratamiento de las células con antipsicóticos también condujera a la activación de SREBP-2 y el aumento de la expresión de sus genes diana. La situación, no obstante, no es tan simple por cuanto, si bien el contenido celular de colesterol propiamente dicho disminuye por efecto de los antipsicóticos, aumenta el de ciertos precursores esteroides inmediatos, los cuales también son capaces de modular la activación de SREBP-2 (Fitzky et al., 2001; Rodríguez-Acebes et al., 2009). Por otra parte, el contenido de esteroides en los lisados celulares no necesariamente refleja el acervo de colesterol regulador que hay en el RE, particularmente si el tráfico intracelular de colesterol está inhibido como ocurre en las células tratadas con los antipsicóticos.

El estudio de la expresión génica se realizó en las células HepG2 por el papel central que puede jugar el hígado en los efectos metabólicos adversos de los antipsicóticos. Para acercarnos a la situación fisiológica, las células se incubaron en presencia de LDL como fuente de colesterol. En general, observamos que el tratamiento con antipsicóticos confería a las células una mayor resistencia a la represión de los genes *SREBF2*, *HMGR* y *LDLR* en respuesta a las LDL. Es más, a tiempos cortos tras su adición detectamos un aumento de la expresión en comparación con la situación basal en la mayor parte de los casos. Estos resultados indican que, a pesar de que las células tratadas con antipsicóticos captan más LDL del medio como reflejan los



estudios con DiI-LDL, el acervo de colesterol (o esterol) regulador debe estar reducido por la inhibición de la biosíntesis de colesterol junto con la imposibilidad de disponer del colesterol que se acumula en los endo-lisomas. De hecho, en las HepG2 incubadas en ausencia de LDL se observa que efectivamente que el tratamiento con cualquiera de los antipsicóticos reduce el contenido celular tanto de colesterol como de esteroides totales (**Tabla 4**). Por lo tanto, los resultados sugieren que en las células expuestas a los antipsicóticos, el “sensor del colesterol”, localizado en el RE, detecta menos colesterol o esteroides y, consecuentemente se dispara una respuesta destinada a subsanar esa aparente deficiencia, estimulando la expresión de la *HMGR* (enzima clave de la colesterogénesis) y del *LDLR* entre otros genes.

Como se ha comentado anteriormente, los efectos de los antipsicóticos en otras líneas celulares varían con respecto a los encontrados en HepG2. Concretamente, aunque en todas ellas disminuye la síntesis y el contenido celular de colesterol, se pueden acumular tantos esteroides intermediarios que la concentración total de esteroides puede llegar a superar la observada en las células incubadas en ausencia de antipsicóticos. Por lo tanto, los efectos sobre la expresión génica en estas otras células pueden diferir de los comentados para las HepG2.

Otros autores habían descrito que los antipsicóticos activan SREBP-1 y consecuentemente la expresión de sus genes diana, básicamente relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos (Ferno et al., 2005; Kristiana et al., 2010; Laressergues et al., 2010; Laressergues et al., 2011). Nosotros quisimos confirmar este extremo, para lo cual medimos los niveles de ARNm de *SREBF1* y de *FASN* en las células HepG2 utilizando el mismo diseño experimental anterior. En general, los resultados muestran una estimulación de la expresión de ambos genes, especialmente a tiempos cortos tras la adición de LDL al medio, que concuerda con los resultados anteriores de otros autores.

Otro gen que mereció nuestra atención fue *ABCA1*, cuya expresión está gobernada por LXR y no por SREBP. Esta proteína está implicada en la salida del colesterol fuera de la célula hacia la apoA-I. Otros autores han reportado un incremento de los niveles de ARNm de *ABCA1* en hepatocitos tras el tratamiento con haloperidol (Vik-Mo et al., 2008) y clozapina (Laressergues et al., 2010) durante 24 h. En ratas, tras una única dosis de clozapina, el ARNm de *ABCA1* en el hígado se incrementa al doble a las 3 h de la inyección, seguido de una disminución a las 12 h y una

estabilización a las 24 h (Ferno et al., 2009). En pacientes tratados prolongadamente con SGA, sin embargo, diversos estudios encuentran un descenso en la concentración plasmática de colesterol-HDL (Pérez-Iglesias et al., 2007; Correll et al., 2009; Albaugh et al., 2011), que contrasta con un supuesto aumento de la ABCA1. Nosotros hemos estudiado la expresión de ABCA1 en las células HepG2 y no hemos observado claros efectos salvo un pequeño incremento a las 2 h tras la adición de las LDL y únicamente para el caso del haloperidol. Desconocemos el mecanismo subyacente así como las causas de estas diferencias entre los distintos estudios. En fibroblastos deficientes para la proteína NPC1, que acumulan colesterol libre en los endo-lisosomas, la expresión de *ABCA1*, de hecho, está disminuida (Choi et al., 2003), al contrario que la expresión de *SREBF2* y de sus genes diana (Garver et al., 2007). Por lo tanto, salvo un papel especial sobre la LXR de alguno de los intermediarios esteroides que se acumulan en presencia de haloperidol (Yang et al., 2006), la causa de aquel pequeño incremento no es evidente.

#### **4. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS SAPONIFICABLES**

La hipertrigliceridemia es uno de los efectos adversos más prevalentes en los pacientes tratados con antipsicóticos. Este efecto es independiente del incremento de peso, que también se da en estos pacientes. Un reciente estudio en ratas relaciona la hipertrigliceridemia producida por el tratamiento con olanzapina, con el incremento de la expresión en tejido adiposo de SREBP-1 y sus genes diana implicados en la síntesis de lípidos (Skrede et al., 2013). Como acabamos de describir, en las células HepG2 también se produce un incremento en los niveles de ARNm de *SREBF1* y *FASN* tras el tratamiento con antipsicóticos. En línea con estos datos, se había demostrado que ciertos antipsicóticos estimulan la síntesis de fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres en cultivos de hepatocitos primarios (Laouressergues et al., 2010; Laouressergues et al., 2011). Además, el tratamiento agudo con clozapina en ratas produce un incremento de los triglicéridos, fosfolípidos y de colesterol en el hígado (Ferno et al., 2009). Nosotros hemos estudiado analizado la síntesis de estos lípidos en células HepG2 y los resultados muestran que todos los antipsicóticos estudiados, en mayor o menor medida, incrementan la síntesis de fosfolípidos y de triglicéridos, especialmente horas después de haber sido retirados del medio de cultivo. Estos resultados confirman básicamente los ya publicados para haloperidol, clozapina y risperidona por otros autores

(Lauressergues et al., 2010; Lauressergues et al., 2011), pero además extienden el estudio a la ziprasidona. Comparativamente, la ziprasidona fue el antipsicótico más activo cuando se encontraba presente en el medio de cultivo, pero en el periodo de lavado es la clozapina la que tiene mayor efecto, estimulando no sólo la síntesis de triglicéridos y de fosfolípidos sino también la de ésteres de colesterol y de ácidos grasos libres. Este efecto estimulador de la ziprasidona se asocia con la aumentada expresión de *FASN* que presentan las células mientras están siendo expuestas a este antipsicótico (**Tabla 8**). Por su parte, en el periodo de lavado, las células tratadas previamente con clozapina fueron las que mostraron mayor expresión de *FASN*, lo que se corresponde con la aumentada síntesis de ácidos grasos y lípidos saponificables que se observa en este caso. Por lo tanto, los resultados apoyan que la aumentada síntesis de estos lípidos se debe al aumento de la expresión de *FASN*. No obstante, sería necesario determinar la actividad de dicha enzima para demostrar definitivamente dicha posibilidad.

### **5. EFECTO DE LOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE LA SECRECIÓN DE APOB**

Los triglicéridos circulantes proceden mayoritariamente del hígado, donde se sintetizan, se empaquetan junto a otros lípidos y la apoB dando lugar a las VLDL que son secretadas al torrente sanguíneo (Ginsberg et al., 2005). Dado el aumento en la síntesis de lípidos saponificables observado en las células tratadas con antipsicóticos, nos propusimos estudiar los efectos de estos fármacos sobre la secreción de la apoB en HepG2, centrándonos especialmente en el periodo de lavado, por ser éste el periodo de mayor activación de la síntesis de lípidos. Observamos un incremento en la secreción de apoB, de manera dosis dependiente, con todos los antipsicóticos estudiados: haloperidol, clozapina, risperidona y ziprasidona. Esta es la primera vez que se describe que el tratamiento con antipsicóticos favorece la síntesis y secreción de apoB. Otros autores habían observado la sobreexpresión de apoE en cultivos de células del sistema nervioso central y del hígado por efecto de los antipsicóticos (Vik-Mo et al., 2008). Teniendo en cuenta que los triglicéridos son el principal sustrato que regula el metabolismo de la apoB para el empaquetamiento y secreción de las VLDL (Ginsberg et al., 2005), el efecto estimulador sobre la síntesis y secreción de apoB podría atribuirse a la acreción de lípidos provocada por los antipsicóticos. Este aumento de la secreción de apoB, previsiblemente en forma de VLDL, puede explicar la hipertrigliceridemia y la

aumentada concentración de apoB que se observan en pacientes tratados durante largo tiempo con antipsicóticos (Wetterling, 2003).

### **6. EFECTOS DE LA CURCUMINA SOBRE LA ACUMULACIÓN INTRACELULAR DE LÍPIDOS PROVOCADA POR LOS ANTIPSICÓTICOS**

Hasta aquí hemos comentado las alteraciones en la homeostasis intracelular de lípidos que producen los antipsicóticos. Estas alteraciones tienen como resultado último la acumulación intracelular de lípidos, produciendo un fenotipo celular parecido al de algunas esfingolipidosis, en especial la enfermedad de Niemann Pick Tipo C1. Lloyd-Evans y colaboradores describieron que la curcumina, un polifenol que se obtiene del rizoma de la *Curcuma longa*, alivia el bloqueo del tráfico que se produce en el Niemann Pick Tipo C1, mejorando el fenotipo celular y alargando la vida de ratones que padecen la enfermedad (Lloyd-Evans et al., 2008). Con estos antecedentes, nos preguntamos si la curcumina podría rescatar el bloqueo del tráfico intracelular producido en las células tratadas con antipsicóticos, mejorando el fenotipo celular y corrigiendo en parte el efecto metabólico.

En células HepG2 previamente tratadas con los antipsicóticos, que acumulan colesterol libre procedente de LDL en grandes endo-lisomas localizados en la zona perinuclear, de forma llamativa el tratamiento con curcumina durante sólo 2 h tuvo un marcado efecto sobre dichas vesículas, disminuyendo su tamaño y localizándose preferentemente en la periferia de la célula, junto a la membrana. Estos cambios fenotípicos indicaban que el tratamiento con curcumina reducía el bloqueo del tráfico intracelular producido por los antipsicóticos y promovía el transporte de vesículas más pequeñas hacia la membrana celular.

Estos efectos se vieron reforzados tras la observación de que la curcumina favorecía la salida de colesterol de la célula, especialmente cuando las células habían sido tratadas con los antipsicóticos. El efecto facilitador de la curcumina sobre la salida de colesterol de las células ya había sido descrito en otros tipos celulares por otros autores, efecto que atribuían a un aumento en la expresión de ABCA1 (Dong et al., 2011; Zhao et al., 2012). Sin embargo, nuestros ensayos para medir la salida de colesterol desde la célula al medio extracelular se realizaron en ausencia de suero, es decir, en ausencia de apoA-I, que es la apolipoproteína que recoge el colesterol

transferido por aquel transportador. Por lo tanto, la contribución de ABCA1 en la salida de colesterol medida en nuestros ensayos debe ser mínima. Este dato, junto con la aparición de vesículas en la periferia de la membrana, nos indujo a pensar que la curcumina favorecía la salida de colesterol de la célula a través de vesículas.

Durante el proceso de maduración de los endosomas se forman vesículas intraluminales que dan lugar a los denominados cuerpos multivesiculares o MVB (Huotari and Helenius, 2011). Las vesículas intraluminales pueden ser secretadas en forma de exosomas al fusionarse los MVB con la membrana celular (Huotari and Helenius, 2011). Aunque la función de los exosomas ha estado en entredicho durante largo tiempo, actualmente se acepta que juegan un papel importante en la salida de material intracelular para la comunicación entre células (Record et al., 2011; Ludwig and Giebel, 2012). Por otra parte, los exosomas contienen enzimas lipolíticas en su interior (Subra et al., 2010) y sus membranas están enriquecidas en colesterol y otros lípidos, habiéndose sugerido que los exosomas juegan un papel en la secreción de lípidos fuera de la célula (Klein et al., 2005; Strauss et al., 2010; Subra et al., 2010). De hecho, Strauss y colaboradores demostraron que la salida de colesterol a través de los exosomas es un mecanismo para evitar el bloqueo del tráfico intracelular de lípidos que, de otra forma, podría ser tóxico para la célula como ocurre en la enfermedad de NPC (Strauss et al., 2010).

Aunque los mecanismos que gobiernan la formación y secreción de los exosomas no se conocen en detalle, se ha descrito que el incremento de la concentración de calcio en el citosol fomenta la secreción de exosomas (Rodríguez et al., 1997; Chen et al., 2010). La concentración de calcio citosólico es clave en muchos procesos celulares y está estrechamente regulada, principalmente gracias a la acción de la *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) (Brini and Carafoli, 2009). A este respecto, la taspigargina, un inhibidor de la SERCA, incrementa la concentración de calcio citosólico y favorece la salida de exosomas (Savina et al., 2003). La curcumina también es capaz de elevar los niveles de calcio citosólico al afectar la actividad de la SERCA (Bilmen et al., 2001). Todos estos antecedentes determinaron el siguiente paso en nuestra investigación, que fue estudiar si la secreción de colesterol al medio extracelular era vía exosomas.

Debido a que los exosomas tienen su origen en los endosomas, estudiamos si el tratamiento con curcumina producía la salida de componentes de los endo-lisosomas al

medio extracelular. Primeramente analizamos la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -hexosaminidasa (Griffiths et al., 1990; Conde-Vancells et al., 2008; Mathivanan and Simpson, 2009; Chen et al., 2010; Mathivanan et al., 2012) y observamos que la curcumina incrementaba la liberación de dicha enzima al medio de cultivo, especialmente en las células previamente tratadas con los antipsicóticos. A continuación analizamos otros marcadores comúnmente usados para identificar exosomas, como CD63 y flotilina-2 (Griffiths et al., 1990; Conde-Vancells et al., 2008; Mathivanan and Simpson, 2009; Chen et al., 2010; Strauss et al., 2010; Mathivanan et al., 2012), obteniendo resultados que confirmaban que la curcumina favorecía la salida de exosomas. Otras evidencias sobre la naturaleza de estas vesículas fueron la demostración mediante citometría de flujo de que las vesículas aisladas por ultracentrifugación tienen CD63 en su superficie, además de DiI derivado de las DiI-LDL, todo lo cual indica que estas vesículas tienen un origen claramente endosomal. Por último las vesículas aisladas fueron analizadas mediante microscopía electrónica, lo que permitió confirmar que tenían un tamaño entre 50-100 nm, igual al descrito para exosomas (Valadi et al., 2007; Strauss et al., 2010; Record et al., 2011). A la luz de estos resultados podemos concluir que la curcumina promueve la salida de exosomas en la línea celular HepG2. El hecho de que este efecto fuera más pronunciado en las células tratadas con los antipsicóticos es interesante. Aunque esta mayor efectividad pueda deberse simplemente al mayor contenido de lípidos en los endo-lisomas que de partida tienen estas células, el hecho es ventajoso por cuanto permite que las células tratadas con los antipsicóticos sean las más beneficiadas por la curcumina.

Teniendo en cuenta este efecto de la curcumina sobre el bloqueo del tráfico intracelular de LDL, nos estudiamos también si la curcumina afectaba la expresión de genes controlados por el factor de transcripción SREBP-2. Observamos que la curcumina producía un rápido descenso en la cantidad del ARNm para *SREBF2* así como en sus genes diana *HMGR* y *LDLR*, efecto que, de nuevo, era más pronunciado en las células tratadas previamente con los antipsicóticos. Este efecto podría deberse a una represión de la maduración de SREBP-2 por la llegada de colesterol al RE, debido al desbloqueo del tráfico intracelular. El mecanismo a través del cual la curcumina ejerce estos efectos se desconoce, aunque probablemente estén relacionados con cambios en el metabolismo del calcio intracelular. Esta hipótesis, no obstante, debe ser corroborada con experimentos más directos.

La secreción de exosomas se ha descrito en distintos tipos celulares como macrófagos (O'Neill and Quah, 2008; Yang et al., 2011), epiteliales (van Niel et al., 2001), neurogliales (Fevrier et al., 2004), renales (Klein et al., 2005) y hepáticas (Calzolari et al., 2006; Conde-Vancells et al., 2008). También se ha demostrado la secreción de exosomas *in vivo* en el hígado de ratones (Masyuk et al., 2013). Hasta la fecha, el papel asignado a los exosomas en la fisiopatología hepática se limita a la carcinogénesis, la hepatitis vírica y la inflamación. Nuestro trabajo sugiere que los exosomas pueden jugar un papel importante en enfermedades hepáticas que cursen con acumulación de lípidos.

A la curcumina se le atribuyen múltiples efectos beneficiosos sobre la inflamación, la hiperlipidemia y la aterosclerosis (Gupta et al., 2012). En particular y centrándonos en el metabolismo lipídico, ya se había demostrado la capacidad de la curcumina para afectar este metabolismo (Peschel et al., 2007; Dou et al., 2008; Kang and Chen, 2009), estimular la secreción de colesterol a través de ABCA1 (Dong et al., 2011; Zhao et al., 2012) y reducir la acumulación celular de colesterol (Kang and Chen, 2009; Zhao et al., 2012). En modelos animales, la administración de curcumina reduce la concentración plasmática de colesterol (Ramírez-Tortosa et al., 1999), lo cual está en concordancia con la sobre-expresión del LDLR observada en las células HepG2 (Peschel et al., 2007; Dou et al., 2008). Por otro lado, la curcumina reduce la captación de las LDL oxidadas y provoca la secreción de colesterol de los macrófagos, contribuyendo a retrasar el desarrollo de la arteriosclerosis en los ratones apoE<sup>-/-</sup> (Zhao et al., 2012). En los ratones mutantes para NPC1, la curcumina se ha visto que prolonga la supervivencia y mejora la ganancia de peso y la actividad física de los animales (Lloyd-Evans et al., 2008). En contraposición, Borbon y colaboradores han descrito un variable, pero ligero, incremento en la supervivencia de los ratones NPC<sup>-/-</sup> por efecto de la curcumina (Borbon et al., 2012), lo cual cuestiona la eficacia de este polifenol en la neurodegeneración en este modelo animal. No obstante, la curcumina previene y protege frente a los efectos secundarios de diferentes aminas cationicas en modelos animales. Así, se ha demostrado en ratas que la curcumina protege frente a los daños inducidos en el hígado por el tratamiento con tamoxifeno, recuperándose los niveles basales de las enzimas hepáticas (El-Beshbishy et al., 2010). También se ha descrito que la administración de curcumina en ratas previene los movimientos oro-faciales involuntarios y la hiperactividad de los receptores D<sub>2</sub> de dopamina provocados por el

tratamiento con haloperidol (Bishnoi et al., 2008; Sookram et al., 2011). En los ratones tratados con N-metil *N*-nitrosourea, la administración de curcumina normaliza los niveles alterados de lípidos totales, colesterol y fosfolípidos en las preparaciones de membrana de cerebro y cerebelo (Singla and Dhawan, 2012). Finalmente, se han descrito efectos beneficiosos de la curcumina en diferentes enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Natarajan and Bright, 2002), el Alzheimer (Frautschy et al., 2001) y la senescencia (Sun et al., 2013). La secreción de exosomas inducida por curcumina que describimos en este trabajo, como un mecanismo para la secreción de diverso material de depósito fuera de la célula, podría contribuir a ampliar la gran variedad de efectos potencialmente beneficiosos de este polifenol.



*Conclusiones*

---



## CONCLUSIONES

1. Los antipsicóticos, tanto los de primera generación o típicos (haloperidol) como los de segunda o atípicos (clozapina, risperidona y ziprasidona), inhiben la biosíntesis de colesterol en su etapa final de interconversión de esteroides, en distintos tipos celulares *in vitro*.

2. Los cambios observados en la incorporación de acetato radiactivo y en el perfil de esteroides permiten concluir que la risperidona y la ziprasidona, al igual que el haloperidol, inhiben las siguientes actividades enzimáticas, en este orden:  $\Delta^7$ -reductasa >  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa =  $\Delta^5$ -desaturasa >  $\Delta^{14}$ -reductasa, siendo la potencia relativa: ziprasidona > haloperidol > risperidona. Por su parte, la clozapina afecta principalmente las actividades de  $\Delta^{24}$ -reductasa y  $\Delta^{8,7}$ -isomerasa.

3. Las consecuencias de esta inhibición sobre el contenido celular de colesterol y la acumulación de esteroides intermediarios dependen de la actividad relativa de las vías de Bloch (insaturada) y de Kandutsch-Russell (saturada) y de la actividad global de síntesis de esteroides, propias de cada tipo celular.

4. Todos los antipsicóticos estudiados promueven la acumulación de colesterol libre procedente de las LDL en los endo-lisomas, aparentemente por inhibición de su salida hacia el retículo endoplásmico, sin afectar la actividad hidrolítica en dicho compartimento ni pasos más tempranos de la endocitosis de las LDL. A diferencia de lo que ocurre con otros agentes que inhiben el tráfico intracelular de colesterol, como el U18666A, los antipsicóticos no provocan la acumulación de esfingomielina en los endo-lisomas.

5. En las células HepG2, los antipsicóticos incrementan la expresión de *SREBF2* y de sus genes diana (*HMGR* y *LDLR*), probablemente como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de colesterol y de la llegada al retículo endoplásmico del colesterol de

## Conclusiones

---

las LDL. Esta respuesta, tendente a corregir la falsa deficiencia de colesterol detectada, agrava la acumulación de colesterol en los endo-lisomas.

6. Tras retirar los antipsicóticos del medio de cultivo, la biosíntesis de colesterol se recupera o incluso puede llegar a ser más activa que en la condición basal, lo que se interpreta por la confluencia de la desaparición de la inhibición directa de aquellas enzimas y el incremento de su expresión por la activación de SREBP-2. Por lo tanto, *in vivo* se esperan ciclos de inhibición/activación de la colesterogénesis a lo largo del tiempo en función de la pauta del tratamiento con los antipsicóticos y de su metabolización.

7. El tratamiento con antipsicóticos estimula la expresión de *SREBF1* y de su gen diana *FASN*, efecto que se acompaña de cambios en la síntesis de lípidos saponificables. La ziprasidona fue el más potente estimulando la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos en el periodo de exposición al fármaco, mientras que clozapina y haloperidol lo fueron tras ser retirados del medio de cultivo.

8. Durante el periodo de lavado, los antipsicóticos también incrementan la síntesis y secreción de apoB por las células HepG2, lo cual puede atribuirse a la acreción de lípidos producida.

9. La curcumina, un polifenol que incrementa el nivel citosólico de calcio, promueve la secreción de exosomas en las células HepG2 y las THP1 diferenciadas a macrófagos.

10. El tratamiento con curcumina reduce el tamaño de los endo-lisomas cargados de lípidos y provoca su redistribución hacia la periferia celular en las células tratadas con antipsicóticos o U18666A, y estimula la salida del colesterol y DiI derivados de las LDL endocitadas, al exterior celular. Este efecto, que supone una mejoría en el depósito intracelular de lípidos promovido por los antipsicóticos, podría aliviar los efectos adversos sobre el metabolismo lipídico que ejercen estos fármacos.

## *Bibliografía*

---



## BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Dargham A, Laruelle M (2005) Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 20:15-27.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
- Aguzzi A, Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64:783-790.
- Albaugh VL, Singareddy R, Mauger D, Lynch CJ (2011) A double blind, placebo-controlled, randomized crossover study of the acute metabolic effects of olanzapine in healthy volunteers. *PLoS One* 6:e22662.
- Alves I, Staneva G, Tessier C, Salgado GF, Nuss P (2011) The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim Biophys Acta* 1808:2009-2018.
- Allison DB, Mentore JL, Heo M, Chandler LP, Cappelleri JC, Infante MC, Weiden PJ (1999) Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 156:1686-1696.
- Azevedo LC, Janiszewski M, Pontieri V, Pedro Mde A, Bassi E, Tucci PJ, Laurindo FR (2007) Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Crit Care* 11:R120.
- Bae SH, Paik YK (1997) Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem J* 326 ( Pt 2):609-616.
- Baptista T, Lacruz A, Angeles F, Silvera R, de Mendoza S, Mendoza MT, Hernandez L (2001) Endocrine and metabolic abnormalities involved in obesity associated with typical antipsychotic drug administration. *Pharmacopsychiatry* 34:223-231.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Belter A, Skupinska M, Giel-Pietraszuk M, Grabarkiewicz T, Rychlewski L, Barciszewski J (2011) Squalene monooxygenase - a target for hypercholesterolemic therapy. *Biological chemistry* 392:1053-1075.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771-1775.
- Bilmen JG, Khan SZ, Javed MH, Michelangeli F (2001) Inhibition of the SERCA Ca<sup>2+</sup> pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP. *Eur J Biochem* 268:6318-6327.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK (2008) Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 88:511-522.
- Bobo WV, Jayathilake K, Lee MA, Meltzer HY (2010) Changes in weight and body mass index during treatment with melperone, clozapine and typical neuroleptics. *Psychiatry Res* 176:114-119.
- Boogaard A, Griffioen M, Cohen LH (1987) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in human hepatoma cell line Hep G2. Effects of inhibitors of cholesterol synthesis on enzyme activity. *Biochem J* 241:345-351.

- Borbon IA, Hillman Z, Duran E, Jr., Kiela PR, Frautschy SA, Erickson RP (2012) Lack of efficacy of curcumin on neurodegeneration in the mouse model of Niemann-Pick C1. *Pharmacol Biochem Behav* 101:125-131.
- Botham KM, Bravo E (1995) The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Progress in lipid research* 34:71-97.
- Brini M, Carafoli E (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89:1341-1378.
- Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL (2002) Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Molecular cell* 10:237-245.
- Brown MS, Goldstein JL (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* 249:7306-7314.
- Brown MS, Goldstein JL (1976) Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell* 9:663-674.
- Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 72:743-747.
- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
- Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340.
- Bubser M, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Roth BL, Deutch AY (2001) Distribution of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in afferents of the rat striatum. *Synapse* 39:297-304.
- Buchanan RW, Kreyenbuhl J, Kelly DL, Noel JM, Boggs DL, Fischer BA, Himelhoch S, Fang B, Peterson E, Aquino PR, Keller W (2010) The 2009 schizophrenia PORT psychopharmacological treatment recommendations and summary statements. *Schizophrenia bulletin* 36:71-93.
- Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology* 17:879-887.
- Calabresi L, Baldassarre D, Castelnuovo S, Conca P, Bocchi L, Candini C, Frigerio B, Amato M, Sirtori CR, Alessandrini P, Arca M, Boscutti G, Cattin L, Gesualdo L, Sampietro T, Vaudo G, Veglia F, Calandra S, Franceschini G (2009) Functional lecithin: cholesterol acyltransferase is not required for efficient atheroprotection in humans. *Circulation* 120:628-635.
- Calkin AC, Tontonoz P (2010) Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30:1513-1518.
- Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fievet C, Roig R, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC (2008) Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J Lipid Res* 49:1904-1911.
- Calvo D, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA, Vega MA (1997) CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17:2341-2349.
- Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasuncion MA, Vega MA (1998) Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 39:777-788.
- Calzolari A, Raggi C, Deaglio S, Sposi NM, Stafsnes M, Fecchi K, Parolini I, Malavasi F, Peschle C, Sargiacomo M, Testa U (2006) Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 119:4486-4498.
- Cenedella RJ (1983) Source of cholesterol for the ocular lens, studied with U18666A: a cataract-producing inhibitor of lipid metabolism. *Experimental eye research* 37:33-43.
- Cirera-Salinas D, Pauta M, Allen RM, Salerno AG, Ramírez CM, Chamorro-Jorganes A, Wanschel AC, Lasuncion MA, Morales-Ruiz M, Suárez Y, Baldan A, Esplugues E, Fernández-Hernando C (2012) Mir-33 regulates cell proliferation and cell cycle progression. *Cell Cycle* 11:922-933.



- Clarke PR, Hardie DG (1990) Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *The EMBO journal* 9:2439-2446.
- Coccorello R, Caprioli A, Ghirardi O, Conti R, Ciani B, Daniele S, Bartolomucci A, Moles A (2006) Chronic administration of olanzapine induces metabolic and food intake alterations: a mouse model of the atypical antipsychotic-associated adverse effects. *Psychopharmacology (Berl)* 186:561-571.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology* 19:43-51.
- Coll T, Rodríguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X, Vazquez-Carrera M (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Current molecular pharmacology* 2:46-55.
- Conde-Vancells J, Rodríguez-Suárez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, Falcon-Pérez JM (2008) Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 7:5157-5166.
- Conley RR, Kelly DL (2005) Second-generation antipsychotics for schizophrenia: a review of clinical pharmacology and medication-associated side effects. *The Israel journal of psychiatry and related sciences* 42:51-60.
- Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R (2013) Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *International journal of molecular sciences* 14:5338-5366.
- Correll CU, Manu P, Olshanskiy V, Napolitano B, Kane JM, Malhotra AK (2009) Cardiometabolic risk of second-generation antipsychotic medications during first-time use in children and adolescents. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 302:1765-1773.
- Cross NL (2003) Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of reproduction* 69:529-534.
- Chang TY, Chang CC, Cheng D (1997) Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annual review of biochemistry* 66:613-638.
- Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y (2006) Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual review of cell and developmental biology* 22:129-157.
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular cell* 7:161-171.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389.
- Chen FW, Li C, Ioannou YA (2010) Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* 5:e15054.
- Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (2004) Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11245-11250.
- Chen HW, Kandutsch AA, Waymouth C (1974) Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* 251:419-421.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 7:53-58.
- Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, Heidenreich RA, Garver WS, Francis GA (2003) Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 278:32569-32577.
- Chugh A, Ray A, Gupta JB (2003) Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Progress in lipid research* 42:37-50.

- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5:e8668.
- Daniel WA, Wojcikowski J (1997) Contribution of lysosomal trapping to the total tissue uptake of psychotropic drugs. *Pharmacol Toxicol* 80:62-68.
- Daniel WA, Wojcikowski J (1999) Lysosomal trapping as an important mechanism involved in the cellular distribution of perazine and in pharmacokinetic interaction with antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol* 9:483-491.
- Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, Cirera-Salinas D, Rayner K, Suresh U, Pastor-Pareja JC, Esplugues E, Fisher EA, Penalva LO, Moore KJ, Suárez Y, Lai EC, Fernández-Hernando C (2011) miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9232-9237.
- DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99:703-712.
- Deng ZB, Liu Y, Liu C, Xiang X, Wang J, Cheng Z, Shah SV, Zhang S, Zhang L, Zhuang X, Michalek S, Grizzle WE, Zhang HG (2009) Immature myeloid cells induced by a high-fat diet contribute to liver inflammation. *Hepatology* 50:1412-1420.
- Dong SZ, Zhao SP, Wu ZH, Yang J, Xie XZ, Yu BL, Nie S (2011) Curcumin promotes cholesterol efflux from adipocytes related to PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway. *Mol Cell Biochem* 358:281-285.
- Dou X, Fan C, Wo L, Yan J, Qian Y, Wo X (2008) Curcumin up-regulates LDL receptor expression via the sterol regulatory element pathway in HepG2 cells. *Planta Med* 74:1374-1379.
- Edwards PA, Ericsson J (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual review of biochemistry* 68:157-185.
- El-Beshbishy HA, Mohamadin AM, Nagy AA, Abdel-Naim AB (2010) Amelioration of tamoxifen-induced liver injury in rats by grape seed extract, black seed extract and curcumin. *Indian J Exp Biol* 48:280-288.
- Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2005) Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest* 115:2489-2498.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 3:87-98.
- Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, Heeren J, von Figura K, Knecht E, Saftig P (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Molecular biology of the cell* 15:3132-3145.
- Farese RV, Jr., Herz J (1998) Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends in genetics* : TIG 14:115-120.
- Fernández C, Lobo M del V, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA (2004) Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Experimental cell research* 300:109-120.
- Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA (2005) Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res* 46:920-929.
- Fernández C, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA (2002) Inhibition of cholesterol biosynthesis by Delta22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Delta24-reductase in mammalian cells. *Biochem J* 366:109-119.
- Ferno J, Raeder MB, Vik-Mo AO, Skrede S, Glambek M, Tronstad KJ, Breilid H, Lovlie R, Berge RK, Stansberg C, Steen VM (2005) Antipsychotic drugs activate SREBP-

- regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: a novel mechanism of action? *Pharmacogenomics J* 5:298-304.
- Ferno J, Skrede S, Vik-Mo AO, Havik B, Steen VM (2006) Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci* 7:69.
- Ferno J, Varela L, Skrede S, Vazquez MJ, Nogueiras R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Steen VM, Lopez M (2011) Olanzapine-induced hyperphagia and weight gain associate with orexigenic hypothalamic neuropeptide signaling without concomitant AMPK phosphorylation. *PLoS One* 6:e20571.
- Ferno J, Vik-Mo AO, Jassim G, Havik B, Berge K, Skrede S, Gudbrandsen OA, Waage J, Lunder N, Mork S, Berge RK, Jorgensen HA, Steen VM (2009) Acute clozapine exposure in vivo induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP, PPAR, and LXR target genes in rat liver. *Psychopharmacology (Berl)* 203:73-84.
- Ferre P (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1:S43-50.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9683-9688.
- Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD (2012) High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:2813-2820.
- Fitzky BU, Moebius FF, Asaoka H, Waage-Baudet H, Xu L, Xu G, Maeda N, Kluckman K, Hiller S, Yu H, Batta AK, Shefer S, Chen T, Salen G, Sulik K, Simoni RD, Ness GC, Glossmann H, Patel SB, Tint GS (2001) 7-Dehydrocholesterol-dependent proteolysis of HMG-CoA reductase suppresses sterol biosynthesis in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz/RSH syndrome. *J Clin Invest* 108:905-915.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Frautschy SA, Hu W, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, Cole GM (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* 22:993-1005.
- Frederick TE, Chebukati JN, Mair CE, Goff PC, Fanucci GE (2009) Bis(monoacylglycero)phosphate forms stable small lamellar vesicle structures: insights into vesicular body formation in endosomes. *Biophysical journal* 96:1847-1855.
- Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P (2005) Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 172:1703-1711.
- Garver WS, Jelinek D, Oyarzo JN, Flynn J, Zuckerman M, Krishnan K, Chung BH, Heidenreich RA (2007) Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse. *Journal of cellular biochemistry* 101:498-516.
- Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W (2006) ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:534-540.
- Giera M, Plossl F, Bracher F (2007) Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids* 72:633-642.
- Gil G, Brown MS, Goldstein JL (1986) Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from the hamster. II. Isolation of the gene and characterization of the 5' flanking region. *J Biol Chem* 261:3717-3724.
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A (2005) Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Archives of medical research* 36:232-240.
- Girault EM, Alkemade A, Foppen E, Ackermans MT, Fliers E, Kalsbeek A (2012) Acute peripheral but not central administration of olanzapine induces hyperglycemia associated with hepatic and extra-hepatic insulin resistance. *PLoS One* 7:e43244.
- Glomset JA, Norum KR (1973) The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Advances in lipid research* 11:1-65.

- Glomset JA, Norum KR, Nichols AV, Forte T, King WC, Albers J, Mitchell CD, Applegate KR, Gjone E (1974) Plasma lipoprotein metabolism in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 137:165-172.
- Goedeke L, Fernández-Hernando C (2012) Regulation of cholesterol homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69:915-930.
- Goldman SD, Funk RS, Rajewski RA, Krise JP (2009) Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis* 1:1445-1459.
- Goldstein JL, Brown MS (1982) The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy. *The Medical clinics of North America* 66:335-362.
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35-46.
- Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS, Ye J (2006) Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab* 3:15-24.
- Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110:659-669.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278:48275-48282.
- Griffiths G, Matteoni R, Back R, Hoflack B (1990) Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J Cell Sci* 95 ( Pt 3):441-461.
- Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE (1986) Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 323:728-731.
- Groszek E, Grundy SM (1978) Electron-microscopic evidence for particles smaller than 250 Å in very low density lipoproteins of human plasma. *Atherosclerosis* 31:241-250.
- Grundy SM (1983) Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annual review of nutrition* 3:71-96.
- Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB (2012) Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39:283-299.
- Han M, Deng C, Burne TH, Newell KA, Huang XF (2008) Short- and long-term effects of antipsychotic drug treatment on weight gain and H1 receptor expression. *Psychoneuroendocrinology* 33:569-580.
- Hardie DG, Pan DA (2002) Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 30:1064-1070.
- Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 14:249-256.
- Hitzemann RJ, Johnson DA (1983) Developmental changes in synaptic membrane lipid composition and fluidity. *Neurochemical research* 8:121-131.
- Hogenboom S, Tuyp JJ, Espeel M, Koster J, Wanders RJ, Waterham HR (2004) Human mevalonate pyrophosphate decarboxylase is localized in the cytosol. *Molecular genetics and metabolism* 81:216-224.
- Holt RI, Peveler RC (2006) Association between antipsychotic drugs and diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 8:125-135.
- Holtta-Vuori M, Tanhuanpaa K, Mobius W, Somerharju P, Ikonen E (2002) Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Molecular biology of the cell* 13:3107-3122.

- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H (1998a) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5987-5992.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H (1998b) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* 101:2331-2339.
- Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Gronborg M, Mobius W, Rhee J, Barr FA, Simons M (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 189:223-232.
- Huang JV, Greyson CR, Schwartz GG (2012) PPAR-gamma as a therapeutic target in cardiovascular disease: evidence and uncertainty. *J Lipid Res* 53:1738-1754.
- Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *The EMBO journal* 30:3481-3500.
- Ingham PW (2001) Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science* 294:1879-1881.
- Janowski BA (2002) The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12675-12680.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731.
- Jassim G, Skrede S, Vazquez MJ, Wergedal H, Vik-Mo AO, Lunder N, Dieguez C, Vidal-Puig A, Berge RK, Lopez M, Steen VM, Ferno J (2012) Acute effects of orexigenic antipsychotic drugs on lipid and carbohydrate metabolism in rat. *Psychopharmacology (Berl)* 219:783-794.
- Jonas A (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1529:245-256.
- Jones B, Basson BR, Walker DJ, Crawford AM, Kinon BJ (2001) Weight change and atypical antipsychotic treatment in patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 2:41-44.
- Kahn RS, Fleischhacker WW, Boter H, Davidson M, Vergouwe Y, Keet IP, Gheorghe MD, Rybakowski JK, Galderisi S, Libiger J, Hummer M, Dollfus S, Lopez-Ibor JJ, Hranov LG, Gaebel W, Peuskens J, Lindfors N, Riecher-Rossler A, Grobbee DE (2008) Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial. *Lancet* 371:1085-1097.
- Kang Q, Chen A (2009) Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 157:1354-1367.
- Kedjouar B, de Medina P, Oulad-Abdelghani M, Payre B, Silvente-Poirot S, Favre G, Faye JC, Poirot M (2004) Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279:34048-34061.
- Kelley RI, Hennekam RC (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 37:321-335.
- Kim J, Yoon H, Ramírez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernández-Hernando C (2012) MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases Abeta levels by repressing ABCA1 expression. *Experimental neurology* 235:476-483.
- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101:1-9.
- Kim JB, Spiegelman BM (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & development* 10:1096-1107.
- Klein D, Bussow H, Fewou SN, Gieselmann V (2005) Exocytosis of storage material in a lysosomal disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 327:663-667.
- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392:193-197.

- Kogure T, Lin WL, Yan IK, Braconi C, Patel T (2011) Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54:1237-1248.
- Koro CE, Fedder DO, L'Italien GJ, Weiss SS, Magder LS, Kreyenbuhl J, Revicki DA, Buchanan RW (2002) Assessment of independent effect of olanzapine and risperidone on risk of diabetes among patients with schizophrenia: population based nested case-control study. *BMJ* 325:243.
- Kovacs WJ, Shackelford JE, Tape KN, Richards MJ, Faust PL, Fliesler SJ, Krisans SK (2004) Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. *Molecular and cellular biology* 24:1-13.
- Kristiana I, Sharpe LJ, Catts VS, Lutze-Mann LH, Brown AJ (2010) Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol. *Pharmacogenomics J* 10:396-407.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* 12:735-739.
- Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH (1996) Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 98:984-995.
- Lange Y, Ye J, Steck TL (1998) Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:18915-18922.
- Lauressergues E, Martin F, Helleboid A, Bouchaert E, Cussac D, Bordet R, Hum D, Luc G, Majd Z, Staels B, Duriez P (2011) Overweight induced by chronic risperidone exposure is correlated with overexpression of the SREBP-1c and FAS genes in mouse liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 383:423-436.
- Lauressergues E, Staels B, Valeille K, Majd Z, Hum DW, Duriez P, Cussac D (2010) Antipsychotic drug action on SREBPs-related lipogenesis and cholesterologenesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 381:427-439.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK (2005) Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353:1209-1223.
- Lindenmayer JP, Czobor P, Volavka J, Citrome L, Sheitman B, McEvoy JP, Cooper TB, Chakos M, Lieberman JA (2003) Changes in glucose and cholesterol levels in patients with schizophrenia treated with typical or atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry* 160:290-296.
- Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E (2007) Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Molecular biology of the cell* 18:47-56.
- Liscum L, Faust JR (1989) The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem* 264:11796-11806.
- Liu J (2008) Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 20:214-221.
- Ludwig AK, Giebel B (2012) Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44:11-15.
- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14:1247-1255.
- Majdalawieh A, Ro HS (2010) PPARgamma1 and LXRAalpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1. *Nuclear receptor signaling* 8:e004.
- Marin Bivens CL, Grondahl C, Murray A, Blume T, Su YQ, Eppig JJ (2004) Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation

- developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. *Biology of reproduction* 70:1458-1464.
- Martínez-Botas J, Ferruelo AJ, Suárez Y, Fernández C, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA (2001) Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1532:185-194.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasuncion MA (1999) Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:1359-1370.
- Masyuk AI, Masyuk TV, Larusso NF (2013) Exosomes in the Pathogenesis, Diagnostics and Therapeutics of Liver Diseases. *J Hepatol PII: S0168-8278(13)00207-9*.
- Mathews M, Muzina DJ (2007) Atypical antipsychotics: new drugs, new challenges. *Cleveland Clinic journal of medicine* 74:597-606.
- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* 40:D1241-1244.
- Mathivanan S, Simpson RJ (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 9:4997-5000.
- Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Faure J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303:531-534.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- Maxfield FR, Mondal M (2006) Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34:335-339.
- Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438:612-621.
- Maxfield FR, Wustner D (2002) Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 110:891-898.
- McIntyre RS, McCann SM, Kennedy SH (2001) Antipsychotic metabolic effects: weight gain, diabetes mellitus, and lipid abnormalities. *Canadian journal of psychiatry Revue canadienne de psychiatrie* 46:273-281.
- Meex SJ, Andreo U, Sparks JD, Fisher EA (2011) Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* 52:152-158.
- Meltzer HY (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21:106S-115S.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin<sub>2</sub> pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251:238-246.
- Meyer JM, Davis VG, McEvoy JP, Goff DC, Nasrallah HA, Davis SM, Daumit GL, Hsiao J, Swartz MS, Stroup TS, Lieberman JA (2008) Impact of antipsychotic treatment on nonfasting triglycerides in the CATIE Schizophrenia Trial phase 1. *Schizophr Res* 103:104-109.
- Meyer JM, Koro CE (2004) The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review. *Schizophr Res* 70:1-17.
- Minet-Ringuet J, Even PC, Lacroix M, Tome D, de Beaurepaire R (2006) A model for antipsychotic-induced obesity in the male rat. *Psychopharmacology (Berl)* 187:447-454.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10:79-104.
- Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HF, Slot JW, Geuze HJ (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4:222-231.

- Nandi S, Ma L, Denis M, Karwatsky J, Li Z, Jiang XC, Zha X (2009) ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J Lipid Res* 50:456-466.
- Natarajan C, Bright JJ (2002) Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* 168:6506-6513.
- Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. (2001) Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* 276:27584-27590.
- Newcomer JW (2008) Introduction: cardiovascular disease and metabolic risk factors in patients with mental illness. *CNS spectrums* 13:1-14.
- Newcomer JW, Hennekens CH (2007) Severe mental illness and risk of cardiovascular disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 298:1794-1796.
- Newcomer JW, Meyer JM, Baker RA, Eudicone JM, Pikalov A, Vester-Blokland E, McQuade RD, Crandall DT, Carson WH, Marcus RN, L'Italien G (2008) Changes in non-high-density lipoprotein cholesterol levels and triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratios among patients randomized to aripiprazole versus olanzapine. *Schizophr Res* 106:300-307.
- O'Neill HC, Quah BJ (2008) Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory. *Sci Signal* 1:pe8.
- Oakley NR, Hayes AG, Sheehan MJ (1991) Effect of typical and atypical neuroleptics on the behavioural consequences of activation by muscimol of mesolimbic and nigro-striatal dopaminergic pathways in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 105:204-208.
- Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klier SA, Hansen BC, Willson TM (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5306-5311.
- Oram JF, Yokoyama S (1996) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 37:2473-2491.
- Oruch R, Hodneland E, Pryme IF, Holmsen H (2008) Psychotropic drugs interfere with the tight coupling of polyphosphoinositide cycle metabolites in human platelets: a result of receptor-independent drug intercalation in the plasma membrane? *Biochim Biophys Acta* 1778:2165-2176.
- Oruch R, Lund A, Pryme IF, Holmsen H (2010) An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J Chem Biol* 3:67-88.
- Ory DS (2004) The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends in cardiovascular medicine* 14:66-72.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12:19-30; sup pp 11-13.
- Pan M, Liang Js JS, Fisher EA, Ginsberg HN (2002) The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis. *J Biol Chem* 277:4413-4421.
- Pant S, Hilton H, Burczynski ME (2012) The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol* 83:1484-1494.
- Parsons B, Allison DB, Loebel A, Williams K, Giller E, Romano S, Siu C (2009) Weight effects associated with antipsychotics: a comprehensive database analysis. *Schizophr Res* 110:103-110.



- Pérez-Iglesias R, Crespo-Facorro B, Amado JA, Garcia-Unzueta MT, Ramírez-Bonilla ML, Gonzalez-Blanch C, Martínez-García O, Vazquez-Barquero JL (2007) A 12-week randomized clinical trial to evaluate metabolic changes in drug-naive, first-episode psychosis patients treated with haloperidol, olanzapine, or risperidone. *J Clin Psychiatry* 68:1733-1740.
- Peschel D, Koerting R, Nass N (2007) Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem* 18:113-119.
- Pfriefer FW (2003) Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1610:271-280.
- Piccoli E, Nadai M, Caretta CM, Bergonzini V, Del Vecchio C, Ha HR, Bigler L, Dal Zoppo D, Faggini E, Pettenazzo A, Orlando R, Salata C, Calistri A, Palu G, Baritussio A (2011) Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype. *Biochem Pharmacol* 82:1234-1249.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology* 17:118-126.
- Polymeropoulos MH, Licamele L, Volpi S, Mack K, Mitkus SN, Carstea ED, Getoor L, Thompson A, Lavedan C (2009) Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophr Res* 108:134-142.
- Pratt HP, Keith J, Chakraborty J (1980) Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. *Journal of embryology and experimental morphology* 60:303-319.
- Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK (2010) PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling* 8:e002.
- Rahier A, Taton M (1996) Sterol biosynthesis: strong inhibition of maize delta 5,7-sterol delta 7-reductase by novel 6-aza-B-homosteroids and other analogs of a presumptive carbocationic intermediate of the reduction reaction. *Biochemistry* 35:7069-7076.
- Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL, Baro L, Ramírez-Tortosa CL, Martínez-Victoria E, Gil A (1999) Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147:371-378.
- Ramírez CM, Dávalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cirera-Salinas D, Suárez Y, Fernández-Hernando C (2011) MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31:2707-2714.
- Rana S, Zoller M (2011) Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis. *Biochem Soc Trans* 39:559-562.
- Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, Hammer RE, Moon YA, Horton JD (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5374-5379.
- Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 328:1570-1573.
- Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M (2011) Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol* 81:1171-1182.
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277:18793-18800.
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development* 14:2819-2830.
- Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL, Luskey KL (1984) HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell* 38:275-285.

- Rhainds D, Brissette L (2004) The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol* 36:39-77.
- Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL (1996) Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem* 271:33545-33549.
- Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M (2003) The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocrine reviews* 24:357-387.
- Rodríguez-Acebes S, de la Cueva P, Fernández-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasuncion MA, Rawson RB, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D (2009) Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem J* 420:305-315.
- Rodríguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997) Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137:93-104.
- Rozman D, Seliskar M, Cotman M, Fink M (2005) Pre-cholesterol precursors in gametogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 234:47-56.
- Ruivo R, Anne C, Sagne C, Gasnier B (2009) Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1793:636-649.
- Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM (2007) Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 282:2483-2493.
- Sánchez-Wandelmer J, Dávalos A, de la Pena G, Cano S, Giera M, Canfran-Duque A, Bracher F, Martín-Hidalgo A, Fernández-Hernando C, Lasuncion MA, Busto R (2010) Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 167:143-153.
- Sánchez-Wandelmer J, Dávalos A, Herrera E, Giera M, Cano S, de la Pena G, Lasuncion MA, Busto R (2009a) Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft/caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1788:1731-1739.
- Sánchez-Wandelmer J, Hernandez-Pinto AM, Cano S, Dávalos A, de la Pena G, Puebla-Jimenez L, Arilla-Ferreiro E, Lasuncion MA, Busto R (2009b) Effects of the antipsychotic drug haloperidol on the somatostatinergic system in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 110:631-640.
- Sato R (2010) Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of biochemistry and biophysics* 501:177-181.
- Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6:131-143.
- Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278:20083-20090.
- Schroepfer GJ, Jr. (1982) Sterol biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 51:555-585.
- Sernyak MJ, Leslie DL, Alarcon RD, Losonczy MF, Rosenheck R (2002) Association of diabetes mellitus with use of atypical neuroleptics in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 159:561-566.
- Serretti A, De Ronchi D, Lorenzi C, Berardi D (2004) New antipsychotics and schizophrenia: a review on efficacy and side effects. *Current medicinal chemistry* 11:343-358.
- Shayman JA, Abe A (2013) Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder. *Biochim Biophys Acta* 1831:602-611.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13656-13661.
- Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes & development* 12:3182-3194.

- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell* 6:77-86.
- Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99:838-845.
- Silve S, Dupuy PH, Labit-Lebouteiller C, Kaghad M, Chalon P, Rahier A, Taton M, Lupker J, Shire D, Loison G (1996) Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J Biol Chem* 271:22434-22440.
- Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S (2009) Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert review of proteomics* 6:267-283.
- Singla N, Dhawan DK (2012) N-methyl N-nitrosourea induced functional and structural alterations in mice brain-role of curcumin. *Neurotox Res* 22:115-126.
- Skrede S, Steen VM, Ferno J (2013) Antipsychotic-induced increase in lipid biosynthesis: activation through inhibition? *J Lipid Res* 54:307-309.
- Smith RC, Lindenmayer JP, Hu Q, Kelly E, Viviano TF, Cornwell J, Vaidhyanathaswamy S, Marcovina S, Davis JM (2010) Effects of olanzapine and risperidone on lipid metabolism in chronic schizophrenic patients with long-term antipsychotic treatment: a randomized five month study. *Schizophr Res* 120:204-209.
- Soccio RE, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24:1150-1160.
- Song BL, DeBose-Boyd RA (2004) Ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in permeabilized cells mediated by cytosolic E1 and a putative membrane-bound ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279:28798-28806.
- Song BL, Javitt NB, DeBose-Boyd RA (2005) Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab* 1:179-189.
- Sookram C, Tan M, Daya R, Heffernan S, Mishra RK (2011) Curcumin prevents haloperidol-induced development of abnormal oro-facial movements: possible implications of Bcl-XL in its mechanism of action. *Synapse* 65:788-794.
- Stahl SM (1998) What makes an antipsychotic atypical? *J Clin Psychiatry* 59:403-404.
- Steck TL, Lange Y (2010) Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends in cell biology* 20:680-687.
- Strauss K, Goebel C, Runz H, Mobius W, Weiss S, Feussner I, Simons M, Schneider A (2010) Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem* 285:26279-26288.
- Suárez Y, Fernández C, Gómez-Coronado D, Ferruelo AJ, Dávalos A, Martínez-Botas J, Lasuncion MA (2004) Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc Res* 64:346-355.
- Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M, Record M (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 51:2105-2120.
- Sudhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS, Sánchez-Pescador R, Bell GI (1985) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* 228:893-895.
- Summerly R, Yardley HJ (1965) The effect of a substituted fluorobutyrophenone(haloperidol) on the metabolism of sterols in rat skin. *Biochem J* 79:30.
- Sun CY, Qi SS, Zhou P, Cui HR, Chen SX, Dai KY, Tang ML (2013) Neurobiological and pharmacological validity of curcumin in ameliorating memory performance of senescence-accelerated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 105C:76-82.
- Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J (2005) Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* 1:379-391.

- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al. (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292-296.
- Takahashi Y, Smith JD (1999) Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11358-11363.
- Tall AR (2008) Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *Journal of internal medicine* 263:256-273.
- Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K (2012) Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 422:377-385.
- Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K (2010) Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 399:384-390.
- Tandon R, Jibson MD (2002) Extrapyramidal side effects of antipsychotic treatment: scope of problem and impact on outcome. *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists* 14:123-129.
- Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Fuki IV, Ng DS, Rothblat GH, Rader DJ (2009) Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 120:160-169.
- Teff KL, Kim SF (2011) Atypical antipsychotics and the neural regulation of food intake and peripheral metabolism. *Physiology & behavior* 104:590-598.
- Templeman LA, Reynolds GP, Arranz B, San L (2005) Polymorphisms of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor and leptin genes are associated with antipsychotic drug-induced weight gain in Caucasian subjects with a first-episode psychosis. *Pharmacogenetics and genomics* 15:195-200.
- Thery C (2011) Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 biology reports* 3:15.
- Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* 3:Unit 3 22.
- Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166:7309-7318.
- Thery C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology* 9:581-593.
- Tontonoz P (2011) Transcriptional and posttranscriptional control of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76:129-137.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-1247.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645:63-70.
- Tuck SF, Patel H, Safi E, Robinson CH (1991) Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol biosynthesis downstream of lanosterol. *J Lipid Res* 32:893-902.
- Ueda K (1997) [Molecular mechanisms for drug transport by MDR1/P-glycoprotein]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* 42:1263-1272.
- Ueda K (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75:401-409.

- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3004-3008.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-659.
- van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M, Kuiper J, Biessen E, van Eck M (2005) Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Current opinion in lipidology* 16:525-535.
- van der Velde AE (2010) Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World journal of gastroenterology* : WJG 16:5908-5915.
- van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2001) Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121:337-349.
- Vaughan AM, Oram JF (2006) ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* 47:2433-2443.
- Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 282:25123-25130.
- Vik-Mo AO, Birkenaes AB, Ferno J, Jonsdottir H, Andreassen OA, Steen VM (2008) Increased expression of lipid biosynthesis genes in peripheral blood cells of olanzapine-treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:679-684.
- Walkley SU, Vanier MT (2009) Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta* 1793:726-736.
- Wang ML, Motamed M, Infante RE, Abi-Mosleh L, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2010) Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab* 12:166-173.
- Wetterling T (2001) Bodyweight gain with atypical antipsychotics. A comparative review. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 24:59-73.
- Wetterling T (2003) [Hyperlipidemia - side-effect of "Atypical" neuroleptics?]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 71:535-540.
- Xu L, Bai Q, Rodríguez-Agudo D, Hylemon PB, Heuman DM, Pandak WM, Ren S (2010) Regulation of hepatocyte lipid metabolism and inflammatory response by 25-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-3-sulfate. *Lipids* 45:821-832.
- Xu Q, Jurgens G, Huber LA, Bock G, Wolf H, Wick G (1992) Lipid utilization by human lymphocytes is correlated with high-density-lipoprotein binding site activity. *Biochem J* 285 ( Pt 1):105-112.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12753-12758.
- Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS (2003) Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3155-3160.
- Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, Westover EJ, Covey DF, Mangelsdorf DJ, Cohen JC, Hobbs HH (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281:27816-27826.
- Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Lin L, Liu Y, Huang JD, Song E (2011) Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 10:117.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500.
- Yogaratanam J, Biswas N, Vadivel R, Jacob R (2013) Metabolic complications of schizophrenia and antipsychotic medications--an updated review. *East Asian archives of psychiatry* :

- official journal of the Hong Kong College of Psychiatrists = Dong Ya jing shen ke xue zhi : Xianggang jing shen ke yi xue yuan qi kan 23:21-28.
- Yokoyama S (1998) [Cellular cholesterol efflux and HDL]. *Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society* 70:1354-1359.
- Yokoyama S (2000) Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta* 1529:231-244.
- Yoshikawa H (1991) Effects of drugs on cholesterol esterification in normal and Niemann-Pick type C fibroblasts: AY-9944, other cationic amphiphilic drugs and DMSO. *Brain Dev* 13:115-120.
- Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325:100-104.
- Zelcer N, Tontonoz P (2006) Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 116:607-614.
- Zhang ZJ, Yao ZJ, Liu W, Fang Q, Reynolds GP (2004) Effects of antipsychotics on fat deposition and changes in leptin and insulin levels. Magnetic resonance imaging study of previously untreated people with schizophrenia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 184:58-62.
- Zhao JF, Ching LC, Huang YC, Chen CY, Chiang AN, Kou YR, Shyue SK, Lee TS (2012) Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 56:691-701.

## *Publicaciones*

---





# Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro<sup>S</sup>

Alberto Canfrán-Duque,\* María E. Casado,\*<sup>†</sup> Óscar Pastor,<sup>§</sup> Jana Sánchez-Wandelmer,\*  
Gema de la Peña,\* Milagros Lerma,\* Paloma Mariscal,\* Franz Bracher,\*\*  
Miguel A. Lasunción,<sup>1,\*†,††</sup> and Rebeca Busto<sup>1,\*†</sup>

Servicio de Bioquímica-Investigación\* y Servicio de Bioquímica-Clínica,<sup>†</sup> Hospital Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain; CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn),<sup>§</sup> Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; Department Pharmazie, Ludwig Maximilians Universität München,\*\* Munich, Germany; and Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,<sup>††</sup> Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

**Abstract** Haloperidol, a typical antipsychotic, has been shown to inhibit cholesterol biosynthesis by affecting  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, and  $\Delta^{14}$ -reductase activities, which results in the accumulation of different sterol intermediates. In the present work, we investigated the effects of atypical or second-generation antipsychotics (SGA), such as clozapine, risperidone, and ziprasidone, on intracellular lipid metabolism in different cell lines. All the SGAs tested inhibited cholesterol biosynthesis. Ziprasidone and risperidone had the same targets as haloperidol at inhibiting cholesterol biosynthesis, although with different relative activities (ziprasidone > haloperidol > risperidone). In contrast, clozapine mainly affected  $\Delta^{24}$ -reductase and  $\Delta^{8,7}$ -isomerase activities. These amphiphilic drugs also interfered with the LDL-derived cholesterol egress from the endosome/lysosome compartment, thus further reducing the cholesterol content in the endoplasmic reticulum. This triggered a homeostatic response with the stimulation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-regulated gene expression. Treatment with SGAs also increased the synthesis of complex lipids (phospholipids and triacylglycerides). Once the antipsychotics were removed from the medium, a rebound in the cholesterol biosynthesis rate was detected, and the complex-lipid synthesis further increased. In this condition, apolipoprotein B secretion was also stimulated as demonstrated in HepG2 cells. **These effects of SGAs on lipid homeostasis may be relevant in the metabolic side effects of antipsychotics, especially hypertriglyceridemia.**—Canfrán-Duque, A., M. E. Casado, O. Pastor, J. Sánchez-Wandelmer, G. de la Peña, M. Lerma, P. Mariscal, F. Bracher, M. A. Lasunción, and R. Busto. **Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro.** *J. Lipid Res.* 2013. 54: 310–324.

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2008-01104 and SAF2011-29951). CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). A.C.D. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación. R.B. is a researcher from FIBio-HRC and is supported by a research contract from the Fondo de Investigación Sanitaria and the Consejería de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid.

Manuscript received 27 March 2012 and in revised form 20 November 2012.

Published, JLR Papers in Press, November 21, 2012

DOI 10.1194/jlr.M026948

**Supplementary key words** second-generation antipsychotic drugs • cholesterol biosynthesis • lipid synthesis • apolipoprotein B secretion • intracellular lipid traffic

The antipsychotic actions of classic neuroleptics (typical or first-generation antipsychotics, FGA) revolutionized the therapy of schizophrenia, but their extensive use has been impeded by side effects, such as extrapyramidal symptoms, and a high incidence of nonresponders. FGAs, such as haloperidol, act predominantly by blocking dopamine D<sub>2</sub> receptors (1). Atypical or second-generation antipsychotics (SGA) display relatively weaker antagonism of dopamine D<sub>2</sub> receptors but potent antagonism to serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors (1). The therapeutic use of SGAs has reduced concern on neurological side effects, but they are not free of metabolically adverse effects. An increase in body weight is fairly rapid after initiating treatment with these drugs. At long term, this may result in overt obesity, along with dyslipidemia, insulin resistance, abnormal glucose tolerance, and diabetes (2–4). Dyslipidemia is commonly manifested as an increase in total triglyceride and a decrease of high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol plasma

Abbreviations: CE, cholesteryl ester; DiI, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; ER, endoplasmic reticulum; FASN, fatty acid synthase; FF-MAS,  $\Delta^{8,14,24}$ -dimethylcholestatrienol; FGA, first-generation antipsychotic; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; LDLR, LDL receptor; LPDS, lipoprotein-deficient serum; MAS-412,  $\Delta^{8,14}$ -dimethylcholestanol; MAS-414,  $\Delta^8$ -dimethylcholestadionel; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; PL, phospholipid; SCD, stearyl-coenzyme A desaturase; SGA, second-generation antipsychotic; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; T-MAS,  $\Delta^{8,24}$ -dimethylcholestadionel; 7DHC, 7-dehydrocholesterol; 7DHD, 7-dehydrodesmosterol.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: rebeca.busto@hrc.es (R.B.); miguel.a.lasuncion@hrc.es (M.A.L.)

<sup>S</sup>The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of three figures and two tables.

concentrations (5). However, important differences among the different antipsychotics exist, more frequently with clozapine than ziprasidone (5–7). More controversial are the potential effects of antipsychotics on blood cholesterol (8). In adult patients with schizophrenia, treatment with clozapine or olanzapine but not haloperidol or risperidone was found to increase total cholesterol levels (9). In youth patients on first medication with SGA, an increase in total and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels were observed with olanzapine but not aripiprazole, quetiapine, or risperidone (10). These measurements were performed in samples obtained on fasting conditions. A fatty meal test revealed a significantly greater increase in very low density lipoprotein (VLDL) levels, both triglyceride and cholesterol, in olanzapine-treated compared with risperidone-treated subjects, demonstrating the alteration in VLDL metabolism (11). Finally, in a study directed to examine gene expression in whole blood, fatty acid biosynthesis genes *FASN* (fatty acid synthase) and *SCD* (stearoyl-CoA desaturase) were overexpressed in olanzapine-treated compared with unmedicated patients (12). It may be relevant to consider whether these metabolic effects are a consequence of weight gain or whether they are independent. In this regard, recent studies in rats have shown that subchronic administration of olanzapine elevates serum TG levels and upregulates the expression of lipogenic SREBP-1-controlled genes independently of weight gain (13).

Cholesterol biosynthesis from acetyl-CoA is a multi-step pathway involving upwards of 20 enzymatic activities (supplemental Fig. 1). There are few data on the effects of antipsychotics on cholesterol biosynthesis. In 1965, Summerly and Yardley were the first to demonstrate that haloperidol inhibits cholesterol biosynthesis in rat skin (14). We previously reported that in both neuroblastoma SH-SY5Y and promyelocytic HL-60 human cell lines, haloperidol inhibited cholesterol biosynthesis, resulting in a decrease in the cell cholesterol content and the accumulation of different sterol intermediates [7-dehydrocholesterol (7DHC), zymostenol, and cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol] depending on the dose of the drug, suggesting the inhibition of  $\Delta^7$ -reductase >  $\Delta^{8,7}$ -isomerase >  $\Delta^{14}$ -reductase enzyme activities in this order (15, 16). By determining the incorporation of radioactive acetate into cholesterol, Kristiana et al. (17) confirmed this effect of haloperidol and reported that SGAs, such as clozapine, quetiapine, olanzapine, risperidone, and ziprasidone, have the ability to inhibit cholesterol biosynthesis, although the affected steps were not elucidated. In contrast, Lauressergues et al. reported that the SGAs clozapine and olanzapine (18) as well as risperidone (19) increased cholesterol biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes, whereas other antipsychotics, such as haloperidol, quetiapine, and aripiprazole, did not affect this pathway (18).

Most antipsychotics are cationic amphiphiles, which are positively charged by virtue of an amine group that can be protonated, and display both hydrophilic and

hydrophobic properties (supplemental Fig. II). Interestingly, other cationic amphiphiles, such as U18666A (20) and tamoxifen (21, 22), have been shown to inhibit several enzymes involved in cholesterol biosynthesis and to affect the LDL endocytotic trafficking to the endoplasmic reticulum (ER). We previously reported that haloperidol interfered with free cholesterol egress from this intracellular compartment to the ER, producing an accumulation of free cholesterol in endosome/lysosome vesicles (16). This effect could be responsible for the upregulation of SREBP and its target genes in response to antipsychotic treatment as observed by others (23–25).

In this study, we analyzed the effects of SGAs on different aspects of intracellular cholesterol homeostasis, including cholesterol biosynthesis and intracellular cholesterol traffic, as well as on fatty acid synthesis and apolipoprotein B100 (apoB100) secretion to elucidate their actions on lipid metabolism.

## METHODS

All chemicals, unless otherwise stated, were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Tres Cantos, Madrid, Spain). The antipsychotics used were clozapine free base (Sigma), haloperidol free base (Sigma), risperidone free base (Sigma), and ziprasidone hydrochloride (Tocris).

### Culture of cells

For this study, three human cell lines were selected. The hepatoma cell line HepG2 (ATCC HB-8065) (Rockville, MD) was chosen because of the intense lipid metabolism of this tissue and its involvement in the metabolism of antipsychotics. The neuroblastoma SH-SY5Y cell line (ATCC CRL-2266) was selected because neurons, from the therapeutic view point, are the main target cells of antipsychotics. Finally, HL-60 promyelocytic cells (ECACC 98070106) are very useful to study cholesterol biosynthesis due to their high proliferation rate. HepG2 cells were cultured in DMEM high glucose (Gibco BRL Invitrogen S.A., Barcelona, Spain) supplemented with MEM nonessential amino acids, 10% fetal bovine serum (FBS), and antibiotics (Gibco BRL) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. SH-SY5Y cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco BRL) medium with L-glutamine supplemented with MEM nonessential amino acids, 10% FBS, and antibiotics. HL-60 leukemia cells were cultured in cholesterol-free ITS+ medium with the following composition: RPMI 1640 supplemented with 625  $\mu$ g/ml transferrin (Roche, Basel, Switzerland), 625  $\mu$ g/ml insulin, 535  $\mu$ g/ml linoleic acid-BSA, 625 ng/ml sodium selenite, 125 mg/ml human serum albumin (Grifols 20%, Barcelona, Spain), and antibiotics. For the experiments, HepG2 and SH-SY5Y cells were cultured in medium with 10% lipoprotein-deficient serum (LPDS) and HL-60 cells in serum-free medium and treated with clozapine, haloperidol, risperidone, or ziprasidone. The antipsychotics were dissolved in DMSO. The final concentration of DMSO in the medium was 0.044%. LPDS was prepared from FBS by ultracentrifugation at a density of 1.21 kg/l. Human LDLs were isolated as described elsewhere (26).

### Immunofluorescence microscopy

Human LDL was labeled with the fluorescent probe DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate,

Life Technologies Corporation, Madrid, Spain) as described elsewhere (27). HepG2 cells were cultured on glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde/PBS for 5 min. Next, the cells were permeabilized in 0.1% triton X-100/PBS for 5 min and incubated with 2% BSA (BSA) in PBS for 45 min. For free cholesterol staining, cells were exposed to filipin (50 mg/1 in PBS) for 45 min. Anti-Lamp2 (Abcam, Cambridge, UK) or anti-CD63 (BD Biosciences) were used at a 1:200 dilution for 2 h, followed by incubation with Alexa fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Invitrogen S.A.) in PBS at a 1:500 dilution for 45 min. Cells were mounted for microscopy and examined on a Nikon D Eclipse C1 confocal microscope.

### Analysis of sterol biosynthesis by HPLC

The cells (HL-60 incubated in cholesterol-free ITS+ medium and HepG2 incubated in DMEM medium containing 10% LPDS) were preincubated for 2 h in the absence (control) or the presence of different antipsychotics at the indicated concentrations, and then the medium was supplemented with 40  $\mu$ Ci of  $^{14}$ C-acetate and incubated for a further 8 h. At the end of the incubation period, the cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed with 10% (w/v) KOH. Then the nonsaponifiable lipids were extracted and used for sterol separation by reverse-phase HPLC, as previously described (28), using a Luna-Pack 5  $\mu$ m pore size C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm; Phenomenex) column for HepG2 cells or a Mediterranea SEA 18 5  $\mu$ m pore size C18 (250  $\times$  4.6 mm, Teknokroma) for HL-60 cells. Lipids were eluted with acetonitrile:water (95:5 v/v) for HepG2 cells or with acetonitrile:water (95:3.5 v/v) for HL-60 cells at a flow rate of 1.2 ml/min. The eluent was monitored simultaneously for UV absorption (Diodo Array 168 detector, Beckman Coulter) and online radioactivity counting (Radioactivity detector LB 509, Berthold Technologies). The eluting sterols were identified by comparison of the retention time and the UV spectrum with those of pure standards. The HPLC method could not resolve zymosterol from cholesterol or zymosterol from desmosterol.

In other experiments, in order to elucidate the cellular response to the removal of the antipsychotic drugs from the medium, HepG2 cells were incubated in DMEM medium containing 10% LPDS in the absence (control) or the presence of the different antipsychotics at 10  $\mu$ M for 16 h. Then the medium was removed and the cells were washed with PBS, and finally, medium without the drugs was added and supplemented with 40  $\mu$ Ci of  $^{14}$ C-acetate. Cells were incubated for a further 8 h and processed as before for the analysis of radioactivity incorporation into sterols.

### Analysis of sterols by GC/MS

Extracted sterols were analyzed as previously described (16). Briefly, total sterols were dissolved in tert-butylmethylether (TBME) and derivatized with silylation reagent (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide/trimethylsilylimidazole 9:1, v/v). Sterols were analyzed using an Agilent 6890N GC and an Agilent 5975 MS detectors (Agilent Technologies) with an Agilent DB-5 ms, 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.1  $\mu$ m. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 ml/min and variable pressure according to retention time locked for 5- $\alpha$  cholestane. The inlet temperature was maintained at 260°C. The oven temperature was initially held at 55°C for two minutes and was increased to 260°C at a rate of 55°C/min, held 10 min, and then increased to 310°C at a rate of 7°C/min. The injector was settled to splitless (injection volume 2  $\mu$ l). GC/MS was carried out using in electron ionization at 70eV. For quantization purposes, the MS detector was operated in selective ion monitoring (SIM) mode

following at least one quantifier and two qualifying ions for each sterol. Peak identification was achieved both by comparison with known external standards and by monitoring characteristic ions as described elsewhere (29).

### RNA isolation and real-time qRT-PCR

Total RNA from HepG2 cells was extracted using TriReagent according to the manufacturer's recommendations and reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase enzyme (Promega, WI) in the presence of the RNase inhibitor RNasin (2 U/ $\mu$ l) (Promega). Real-time PCR amplification was performed on a LightCycler 480 using the SYBR Green I Master kit (Roche Applied Science). The thermocycle protocol consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 10 s. Melting curves were evaluated for each gene, and the PCR reaction products were separated on 2% agarose gels to confirm the presence of a single product. The efficiency of the reaction was evaluated by amplifying serial dilutions of cDNA (1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10,000). We ensured that the relationship between the threshold cycle (Ct) and the log(RNA) was linear ( $-3.6 < \text{slope} < 3.2$ ). All analyses were performed in triplicate, and the target gene copy number was normalized against the housekeeping gene Rplp0 (encoding ribosomal protein large P0). The primers used in the real-time PCRs are shown in supplemental Table I.

### Lipid synthesis assay

HepG2 cells were incubated in the absence (control) or the presence of the different drugs at 10  $\mu$ M. After 20 h,  $^{14}$ C-acetate (2  $\mu$ Ci/ml per well) was added, and incubation was continued for additional 4 h. In other experiments, the cells were incubated in the presence of the drugs or control conditions for 20 h, then the cells were washed twice with PBS and incubated for additional 4 h in plain medium containing  $^{14}$ C-acetate (2  $\mu$ Ci/ml per well). In all cases, at the end of the incubation, cells were washed, and lipids were extracted by the Folch procedure. Lipid extracts were dried and separated into major lipid classes on TLC plates Silica Gel F254 with a mobile phase of hexane:diethyl ether:glacial acetic acid (90:30:1, v/v/v). The lipids bands corresponding to phospholipids (PL), free fatty acid (FFA), triacylglycerides (TG), and cholesteryl ester (CE) were cut into vials, and radioactivity was counted by liquid scintillation.

### Immunoprecipitation of apoB from culture medium or cell lysate

We followed the method published by Meex and coworkers (30). The cells were metabolically labeled with [ $^{35}$ S]methionine (Hartmann Analytic, Germany) during 15 min, then the medium was removed and the cells were incubated with chase medium supplemented with unlabeled methionine. After 180 min, newly synthesized apoB was immunoprecipitated from culture medium as described in Ref. 30. Quantitation of labeled apoB was performed by SDS-PAGE and radioactivity detection using a Typhoon 9400 PhosphorImager. Total protein synthesis was measured by determination of trichloroacetic acid precipitable radioactivity in aliquots of the medium. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor CP-346086 was used at 10  $\mu$ M.

### Statistical analysis

Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using a 2-tailed, unpaired Student *t*-test. The difference between two sets of values was considered significant if the *P* value was less than 0.05.

## RESULTS

## Effects of second-generation antipsychotics on cholesterol biosynthesis

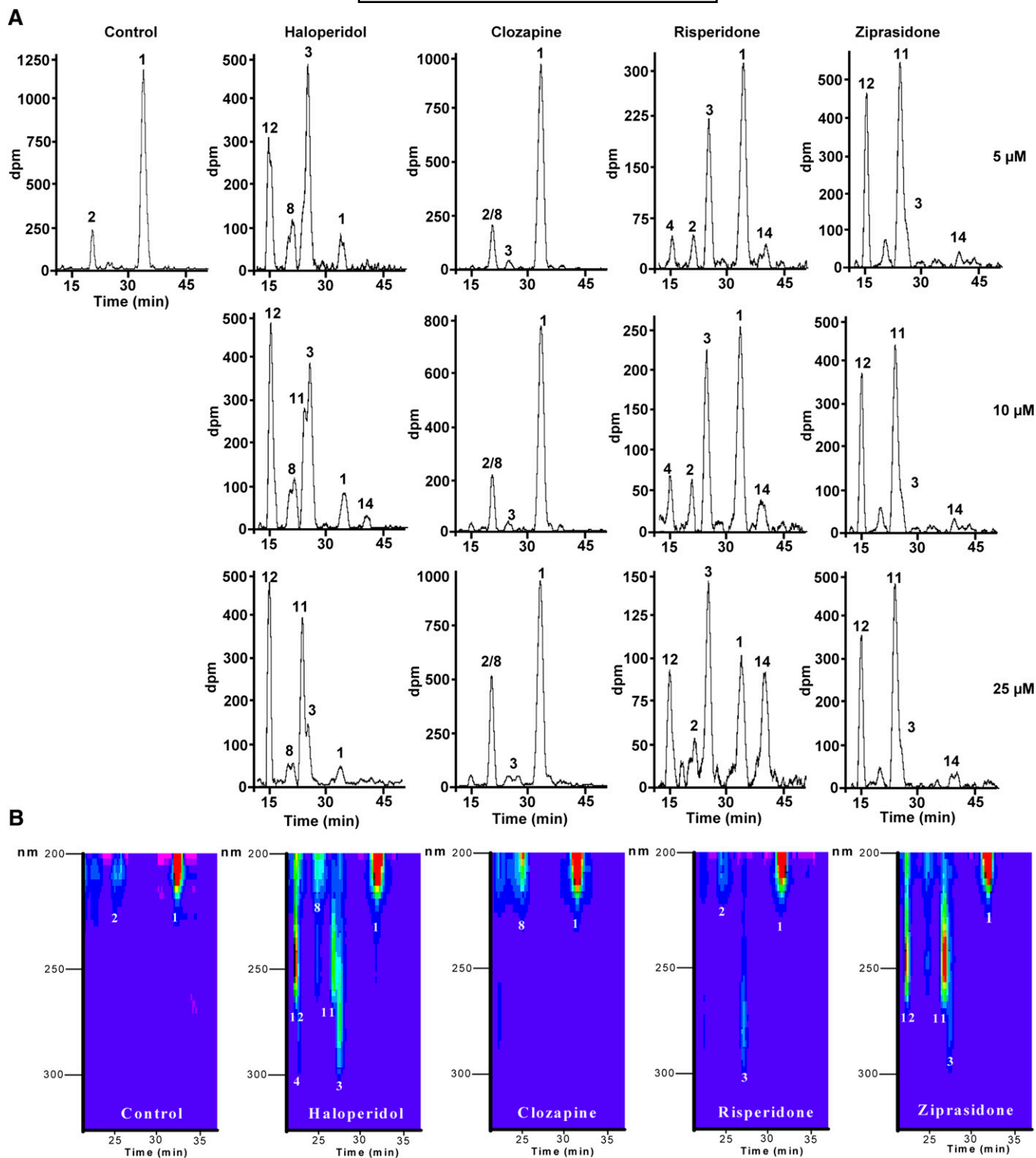
The effects of SGAs (clozapine, risperidone, and ziprasidone) compared with haloperidol on cholesterol biosynthesis were studied. Cells were incubated in the absence (control) or presence of different concentrations of the drugs for a total of 10 h, and the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate into sterols during the last 8 h was determined. In HepG2 cells incubated in control conditions, radioactivity mainly accumulated in cholesterol (peak 1) and desmosterol (peak 2) (Fig. 1A). As expected, treatment with haloperidol resulted in a decrease in radioactivity incorporation into cholesterol (less than 10% of the control) and an increase in the biosynthetic precursors 7DHC, zymosterol, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol and, cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol in a dose-dependent manner (Fig. 1). This confirmed our previous results, using different cell lines, that haloperidol inhibits the cholesterol biosynthetic reactions catalyzed by  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, and  $\Delta^{14}$ -reductase, respectively (15, 16). Treatment with clozapine resulted in a small decrease in radioactivity incorporation into cholesterol (roughly 15% of the control) and an increase in radioactivity incorporation into desmosterol/zymosterol, which was indicative of the inhibition of the  $\Delta^{24}$ -reductase and/or  $\Delta^{8,7}$ -isomerase reaction (Fig. 1). Treatment with risperidone resulted in a decrease in radioactivity incorporation into cholesterol (65–90% of the control) and an increase in 7DHC in a dose-dependent manner. At the highest dose, lanosterol and cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol were also increased. These results are compatible with the inhibition of reactions catalyzed by  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{14}$ -reductase, and 14 $\alpha$ -demethylase due to the effect of risperidone. Finally, ziprasidone even at the lowest dose (5  $\mu\text{M}$ ) completely blocked radioactivity incorporation into cholesterol (Fig. 1), and radioactivity accumulated in 7DHC (compound #3, which was clearly distinguished from compound #11 in the UV-absorption spectra, Fig. 1B), cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, and cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol, which was suggestive of the inhibition of the reactions catalyzed by  $\Delta^7$ - and  $\Delta^{14}$ -reductases, respectively.

The study was extended to HL-60 cells (Table 1 and supplemental Fig. III). In control conditions, these cells accumulated  $^{14}\text{C}$ -radioactivity only in cholesterol. Treatment of cells with haloperidol resulted in a profound decrease in radioactivity incorporation into cholesterol, whereas an increase in the precursors 7DHC, 7-dehydrodesmosterol (7DHD) and cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol was observed. Treatment with risperidone resulted in a decrease in radioactivity incorporation into cholesterol and an increase in 7DHC in a dose-dependent manner, suggesting inhibition of the reaction catalyzed by  $\Delta^7$ -reductase. Ziprasidone resulted in an accumulation of radioactivity in 7DHC, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol, and lanosterol, which was suggestive of the inhibition of the reactions catalyzed by  $\Delta^7$ - and  $\Delta^{14}$ -reductases and 14 $\alpha$ -demethylase, respectively. Clozapine was less potent in inhibiting cholesterol biosynthesis; increments of  $^{14}\text{C}$ -radioactivity in 7DHC, 7DHD, and

lathosterol were observed with the highest dose used (Table 1 and supplemental Fig. III).

To quantify the different sterols, HPLC has some limitations due to the poor resolution between cholesterol/zymosterol and desmosterol/zymosterol. Thus, to determine how the inhibition of cholesterol biosynthesis elicited by SGAs affects the sterol composition of cells, we used GC/MS. For GC/MS experiments, the cells were treated in the absence (control) or presence of different concentrations of the antipsychotic for 24 h and then analyzed. As shown in Table 2, in control conditions, HepG2 cells contained, in addition to cholesterol, small amounts of zymosterol, lathosterol, and desmosterol. All the antipsychotics tested decreased the cholesterol content in a dose-dependent manner, and the concentrations of several cholesterol precursor sterols were increased. In cells treated with haloperidol, 7DHC, zymosterol, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol, and cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol were greatly increased, as well as FF-MAS ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimethylcholestatrienol) and zymosterol at the highest dose used. Treatment with clozapine increased zymosterol, 8-dehydrocholesterol, and desmosterol. Risperidone increased 7DHC, zymosterol, 8-dehydrocholesterol, lathosterol, and desmosterol. Cells treated with ziprasidone showed an increase in 7DHC and, particularly, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol and cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol. Taken together, these results suggest that in HepG2 cells, haloperidol inhibits the activities of  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, and  $\Delta^{14}$ -reductase (Table 2). Clozapine inhibits  $\Delta^{8,7}$ -isomerase and  $\Delta^{24}$ -reductase; risperidone inhibits  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase,  $\Delta^5$ -desaturase, and  $\Delta^{24}$ -reductase; and ziprasidone inhibits  $\Delta^{14}$ -reductase and  $\Delta^7$ -reductase.

The sterol content in HL-60 cells was quite distinct (Table 3). On the one hand, the cholesterol content was about 10  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell protein, three times less than in HepG2 cells. On the other hand, HL-60 cells contained some 7DHC, in contrast to HepG2 cells, which contained desmosterol. These data suggest that the limiting enzyme in HL-60 cells is  $\Delta^7$ -reductase, whereas in HepG2 cells, the limiting enzyme is  $\Delta^{24}$ -reductase. With regard to the changes produced by the antipsychotics, with the exception of clozapine, all of them significantly decreased the content of cholesterol. Haloperidol, even at the lowest concentration used, highly increased the cell content of 7DHC; at increasing drug concentrations, lathosterol, 8-dehydrocholesterol, and zymosterol, as well as cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol and cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol, were also increased. These same cholesterol pathway intermediaries were also affected by treatment with risperidone and ziprasidone but at different intensities. Risperidone greatly increased the content of 7DHC in a dose-dependent manner; at the highest dose, it also increased zymosterol and cholesta-8,14-dienol, substrates of  $\Delta^{8,7}$ -isomerase and  $\Delta^{14}$ -reductase, respectively. Finally, treatment with ziprasidone resulted in marked increases in cholesta-8,14-dienol and cholesta-8,14,24-dienol (substrates of  $\Delta^{14}$ -reductase) and in 7DHC (substrate of  $\Delta^7$ -reductase), as well as a small increase in zymosterol. In HL-60 cells, an increase in lathosterol due to the antipsychotics haloperidol, clozapine, and



**Fig. 1.** A: Effects of antipsychotics on  $^{14}$ C-acetate incorporation into sterols in HepG2 cells. The cells were treated with haloperidol, clozapine, risperidone, or ziprasidone at the indicated concentrations or vehicle (control) and  $^{14}$ C-acetate for 8 h, and radioactivity incorporation into the sterols was determined by HPLC and on-line radioactivity detection. B: UV spectra of eluting sterols in the cells not treated (control) or treated with 25  $\mu$ M of clozapine, haloperidol, risperidone, or ziprasidone. Results from a representative experiment are shown. The numbers are the following: 1, cholesterol; 2, desmosterol; 3, 7DHC; 4, 7DHD; 8, zymosterol; 11, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; 12, cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol; and 14, lanosterol. The HPLC method did not resolve between cholesterol/zymosterol and desmosterol/zymosterol. 7DHC (peak 3) was distinguished from cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (peak 11) and 7DHD (peak 4) from cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (peak 12) by their distinct UV-absorption spectra.

TABLE 1. Effects of antipsychotics on <sup>14</sup>C-acetate incorporation into sterols in HL-60 cells

Sterol (dpm/mg protein)	Control	Haloperidol			Clozapine			Risperidone			Ziprasidone		
		5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM
Lanosterol	–	–	–	27060	–	–	–	–	–	26408	29408	17721	40109
Cholesta-8,14,24-trienol	–	–	–	44469	–	–	–	–	–	–	41335	44593	58558
Cholesta-8,14-dienol	–	–	36361	66734	–	–	–	–	–	–	47363	58015	46173
Lathosterol	–	–	–	–	32350	30455	33184	–	–	–	–	–	30918
7DHD	–	27651	36432	–	19145	–	31846	15031	16695	23690	–	–	–
7DHC	42355	132199	108725	37601	28039	35540	67242	49660	79127	132644	88047	48136	43124
Cholesterol	321658	46990	56015	51693	102550	136253	103498	119141	106697	108902	69844	41799	53882

The cells were treated with haloperidol, clozapine, risperidone, or ziprasidone at the indicated concentrations or vehicle (control) and <sup>14</sup>C-acetate for 8 h, and radioactivity incorporation into the sterols was determined by HPLC. Results from a representative experiment are shown. The HPLC method did not resolve between cholesterol/zymostenol and desmosterol/zymosterol. 7-Dehydrocholesterol was distinguished from cholesta-8,14-dien-3β-ol and 7-dehydrodesmosterol from cholesta-8,14,24-trien-3β-ol by their distinct UV-absorption spectra.

risperidone was seen, indicating Δ<sup>5</sup>-desaturase inhibition in this cell line (Table 3).

We also studied the effects of antipsychotics in SH-SY5Y neuroblastoma cells (supplemental Table II). In control conditions, in addition to cholesterol, the cells contained 7DHC and lathosterol, suggesting that the activity of both Δ<sup>7</sup>-reductase and Δ<sup>5</sup>-desaturase are limiting in this cell line. Treatment with clozapine increased zymostenol levels, showing the inhibition of Δ<sup>8,7</sup>-isomerase in this cell line. Risperidone and ziprasidone inhibited both Δ<sup>7</sup>-reductase and Δ<sup>14</sup>-reductase but with distinct activity, similar to the other cell lines examined (Tables 2 and 3).

#### Effects of the removal of antipsychotics on cholesterol biosynthesis

The present results show that exposure of cells to different antipsychotic drugs inhibited cholesterol biosynthesis and decreased the cholesterol content in cells but increased that of several cholesterol precursors and unphysiological

sterols. Other authors reported that pretreatment of rat hepatocytes with both clozapine (18) and risperidone (19) increased the incorporation of <sup>14</sup>C-acetate radioactivity into free cholesterol when studied 4 h after removing the antipsychotics from the culture medium. Thus, we directly determined the effect of removal of the antipsychotics from the incubation medium on the rate of cholesterol biosynthesis. For this, HepG2 cells were incubated for 16 h in the presence of haloperidol, risperidone, or ziprasidone. Then one set of cells was exposed to the drugs for an additional 8 h. In another set, the medium was removed, the cells were washed, and new medium without drugs was added. During the last 8 h of incubation, the incorporation of <sup>14</sup>C-acetate into sterols was determined. As shown in Fig. 2, in all cases, drug removal resulted in a marked stimulation of radioactivity incorporation into sterols, including cholesterol, compared with cells continuously exposed to the drugs. These results firmly indicate that cholesterol biosynthesis

TABLE 2. Effects of antipsychotics on the sterol content of the cell line HepG2

Sterol (ng/mg protein)	Control	Haloperidol			Clozapine			Risperidone			Ziprasidone		
		5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM	5 μM	10 μM	25 μM
Lanosterol	23	22	27	59	14	25	22	–	–	–	–	–	–
FF-MAS	–	–	39	134	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cholesta-8,14,24-trienol	–	(0.33)	(0.60)	(1.60)	–	–	–	–	–	–	(1.10)	(1.08)	(1.02)
Cholesta-8,14-dienol	–	97	263	2010	–	–	–	–	–	–	3381	3172	2802
Zymosterol	–	–	–	(0.11)	–	–	–	(0.05)	(0.07)	(0.05)	–	–	–
Zymostenol	205	159	271	732	257	249	246	206	218	172	–	–	–
8-Dehydrocholesterol	29	–	–	–	32	86	–	54	41	31	–	–	–
Δ <sup>7,24</sup> -cholestadienol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lathosterol	142	40	–	–	105	177	53	–	–	277	–	–	–
7DHC	–	1149	1565	1935	–	–	–	566	883	1316	631	–	–
Desmosterol	59	–	–	–	69	238	70	115	124	–	–	–	–
Cholesterol	36476	28156	24475	22919	28158	27893	25382	30606	29364	24710	22263	21640	21720
Total sterols	36934	29623	26640	27789	28635	28668	25773	31547	30630	26506	26275	24812	24522

HepG2 cells were left untreated (control) or were treated for 24 h with 5, 10, or 25 μM of the antipsychotic (clozapine, haloperidol, risperidone, or ziprasidone). Lipids were extracted and analyzed by GC/MS. Data are shown as nanograms of each sterol species per milligram of protein, except for those sterol species that were detectable but could not be quantified for lack of standard [in this case, concentration was expressed as a percentage considering the cholesterol area as 100% (shown in parentheses)]. Results are means of two experiments. "Total sterols" was calculated without considering the sterol species that could not be quantified. –, not detectable; FF-MAS, Δ<sup>8,14,24</sup>-dimethylcholestatrienol; MAS-412, Δ<sup>8,14</sup>-dimethylcholestadienol; MAS-414, Δ<sup>8</sup>-dimethylcholestanol; T-MAS, Δ<sup>8,24</sup>-dimethylcholestadienol.

TABLE 3. Effects of antipsychotics on the sterol content of the cell line HL-60

Sterol (ng/mg protein)	Control	Haloperidol			Clozapine			Risperidone			Ziprasidone		
		5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M
Lanosterol	55	53	72	84	71	47	53	72	83	72	84	123	173
Dihydrolanosterol	37	19	–	23	29	16	14	22	–	–	23	20	33
FF-MAS	–	–	–	52	–	–	–	–	–	–	60	86	90
MAS-412	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	125
Cholesta-8,14,24-trienol	–	–	–	(0.87)	–	–	–	–	–	–	(1.37)	(2.29)	(2.02)
Cholesta-8,14-dienol	–	74	206	1122	–	–	–	–	–	206	4177	4407	3764
T-MAS	12	9	10	10	13	–	17	8	26	10	–	–	–
MAS-414	–	–	–	–	–	18	–	–	–	–	–	–	–
Zymosterol	–	–	–	–	–	–	(1.54)	–	–	–	–	–	–
Zymostenol	27	200	371	1051	49	55	70	–	–	371	142	82	43
8-Dehydrocholesterol	31	111	106	105	40	38	41	78	153	106	–	–	–
$\Delta^{7,24}$ -Cholestadienol	–	–	–	–	–	(0.07)	(1.56)	–	–	–	–	–	–
Lathosterol	143	276	271	291	171	142	127	172	106	271	159	82	65
7DHC	204	12044	11800	7352	347	253	317	1318	4253	11800	3434	1977	1239
Desmosterol	–	–	–	–	22	24	77	–	–	–	–	–	–
Cholesterol	10747	5038	4964	5587	11869	10606	9903	10796	7854	4964	5628	5813	6189
Total sterols	11256	17824	17800	15677	12611	11199	10619	12466	12475	17800	13707	12590	11721

HL-60 cells were left untreated (control) or were treated for 24 h with 5, 10, or 25  $\mu$ M of the antipsychotic (haloperidol, clozapine, risperidone, or ziprasidone). Lipids were extracted and analyzed by GC/MS. Data are shown as nanograms of each sterol species per milligram of protein, except for those sterol species that were detectable but could not be quantified for lack of standard [(in this case, the concentration was expressed as a percentage considering the cholesterol area as 100% (shown in parentheses)]. Results are means of two experiments. "Total sterols" was calculated without considering the sterol species that could not be quantified. 7-dehydrodesmosterol was not detectable in the HL-60 samples. –, not detectable; FF-MAS,  $\Delta^{8,14,24}$ -dimethylcholestatrienol; MAS-412,  $\Delta^{8,14}$ -dimethylcholestadienol; MAS-414,  $\Delta^8$ -dimethylcholestanol; T-MAS,  $\Delta^{8,24}$ -dimethylcholestadienol.

is inhibited when drugs are present in the medium and that thereafter, probably as a result of both the alleviation of enzyme inhibition and enzyme induction, cholesterol biosynthesis is activated.

#### Effects of antipsychotics on $^{14}$ C-acetate incorporation into fatty acids and derived lipids

To investigate whether antipsychotics could affect de novo synthesis of lipids, we determined the levels of labeled

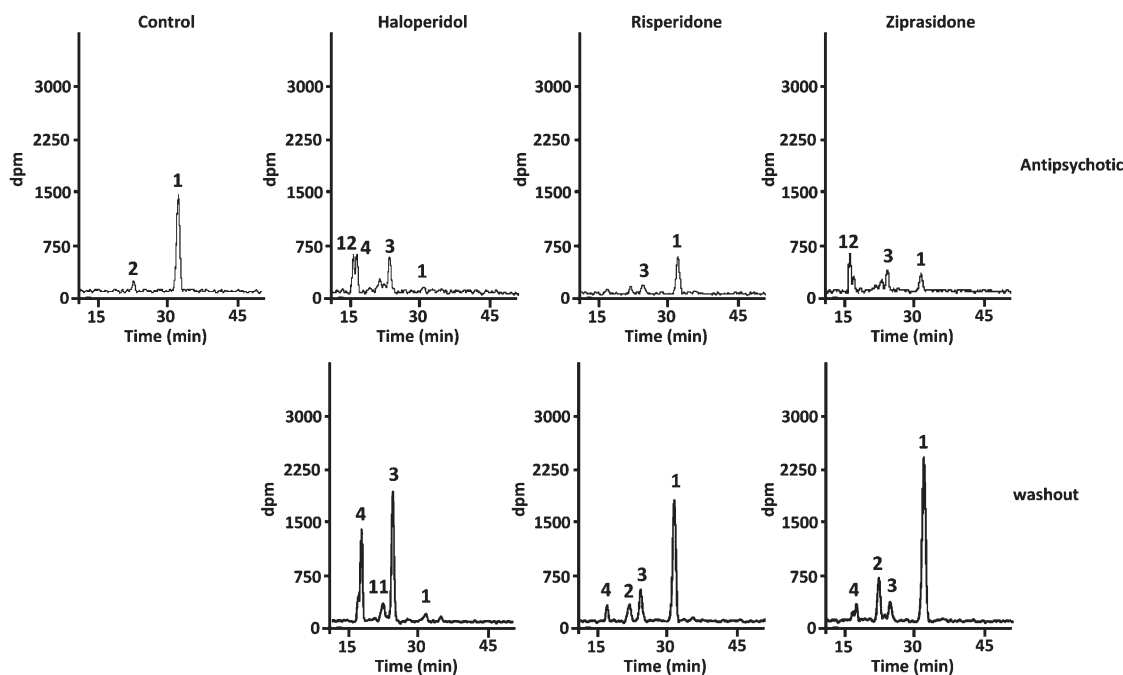


Fig. 2. Effects of the removal of antipsychotics from the medium on  $^{14}$ C-acetate incorporation into sterols. HepG2 cells were treated with haloperidol, risperidone, or ziprasidone at 10  $\mu$ M concentrations or vehicle (control) for 16 h, and then  $^{14}$ C-acetate for 8 h in the absence (washout) or the presence of the antipsychotics. Radioactivity incorporation into the sterols was determined by HPLC and on-line radioactivity detection. Results from a representative experiment are shown. The numbers are the following: 1, cholesterol; 2, desmosterol; 3, 7DHC; 4, 7DHD; 11, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; and 12, cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol.

FFA, PL, TG, and CE produced from  $^{14}\text{C}$ -acetate in HepG2 cells. Two settings were used. In the first,  $^{14}\text{C}$ -acetate was added to cells while antipsychotics (10  $\mu\text{M}$ ) were present in the medium. In the second, cells were pretreated with the antipsychotic, then it was removed, and the tracer was added in the washout period.

When lipid synthesis was analyzed in cells currently treated with the antipsychotics, risperidone and ziprasidone increased  $^{14}\text{C}$ -radioactivity incorporation into both PL and TG, the major lipids in cells, whereas clozapine increased TG synthesis only (Fig. 3). Ziprasidone also increased FFA synthesis compared with the control (not treated with antipsychotics). On the contrary, CE synthesis was decreased by effect of haloperidol and risperidone (Fig. 3).

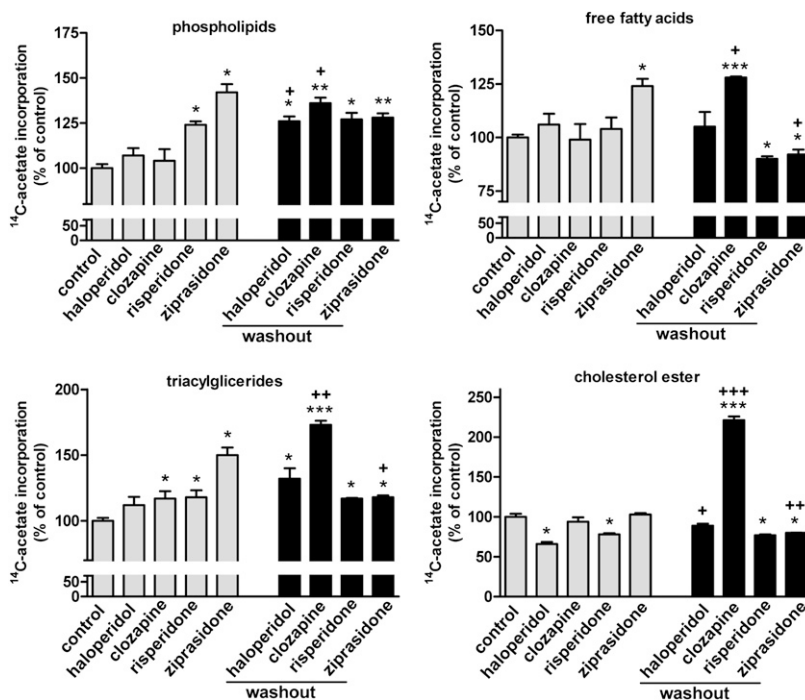
When lipid synthesis was analyzed in the washout period, pretreatment with any of the antipsychotic used, either FGA (haloperidol) or SGA (clozapine, risperidone, and ziprasidone), resulted in a significant increase in radioactivity incorporation into both PL and TG compared with the control (Fig. 3), Clozapine also increased FFA and CE synthesis ( $128 \pm 0.5\%$  and  $221 \pm 4.8\%$ , respectively), whereas risperidone and ziprasidone decreased these parameters (approximately 10–20% with respect to the control) (Fig. 3). In general, the most active antipsychotics stimulating lipid synthesis were

ziprasidone during the treatment period and clozapine during the washout period.

### Effects of antipsychotics on gene expression

We hypothesized that the inhibition of cholesterol biosynthesis exerted by the antipsychotics would result in the activation of SREBP transcription factors, which ultimately could lead to a transitory stimulation of lipid biosynthesis right after the removal of the drugs from the medium. To test this hypothesis, we first measured the mRNA levels of *SREBF2*, *HMGR* (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase), and *LDLR* (LDL receptor), which are regulated by active SREBP-2 (31). HepG2 cells were treated with the antipsychotics (10  $\mu\text{M}$ ) for 2, 4, or 16 h, or for 16 h plus additional 8 h after removing the medium and substitution by medium without drugs (16 h + 8 h) (washout). In HepG2 cells incubated in control conditions, a decline in the expression of these genes was observed (Table 4), which is attributed to the presence of LDL in the incubation medium. In cells treated with antipsychotics, an increase in gene expression was observed, especially at shorter incubation times. At 16 h of incubation, the stimulatory effect persisted for some antipsychotics (Table 4).

In the washout period (16 h + 8 h), likely as a result of the removal of LDL from the incubation medium, the expression of both *SREBF2* and *LDLR* tended to increase in



**Fig. 3.** Effects of antipsychotic on  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into phospholipids, triacylglycerides, free fatty acids, and cholesteryl esters in HepG2 cells. Cells were treated with the antipsychotics (10  $\mu\text{M}$ ) for 24 h or kept untreated (control), and 4 h before ending the experiment,  $^{14}\text{C}$ -acetate was added to the medium. In a second setting (washout), cells were washed to remove the antipsychotics from the medium, and then  $^{14}\text{C}$ -acetate was added. At the end of the experiment, the cells were used for analysis of radioactivity incorporation into major lipid classes by TLC. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in duplicate. The mean of the controls was set at 100%, and all data were normalized versus the control group. Statistical comparisons are shown versus control (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ) or each antipsychotic washout versus antipsychotic present (+ $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ).



all conditions, including the control (Table 4). In general, this rebound effect was more evident in cells pretreated with antipsychotics. Thus, at the end of the washout period, mRNA levels of *SREBF2*, *HMGR*, and *LDLR* in cells pretreated with clozapine were significantly higher than in control cells. Risperidone and ziprasidone also induced a strong rebound, although mRNA levels reached were similar to those found in the control (Table 4). Finally, *HMGR* mRNA levels were more resistant to increase after LDL removal, and in cases where expression levels were relatively high at 16 h (haloperidol, clozapine, and ziprasidone), they even decreased during the washout period.

Once we demonstrated that fatty acids and complex lipid synthesis was increased by FGA and SGA, we analyzed the mRNA expression of *SREBF1* and its associated target gene *FASN*. In control conditions, cells responded to LDL by decreasing the expression of both *SREBF1* and *FASN*, without appreciable changes after the removal of LDL (16 h + 8 h). In cells treated with antipsychotics, higher expression levels of both *SREBF1* and *FASN* were observed compared with the control, especially at shorter incubation times ( $\leq 4$  h) (Table 4). In the washout period (16 h + 8 h), compared with the preceding time studied (16 h), no significant changes in the expression of *SREBF1* were observed in cells treated with haloperidol

and clozapine, whereas a further decline in gene expression was observed in cells treated with risperidone and ziprasidone. Regarding *FASN*, expression levels further decreased in the washout period with all drugs tested except risperidone (Table 4).

Finally, we measured expression levels of *ABCA1*, which is mainly governed by LXR. In cells incubated in control conditions, no appreciable changes in *ABCA1* mRNA levels were observed in response to LDL (times 0–16 h) and after its removal (16 h + 8 h) (Table 4). In cells treated with antipsychotic drugs, no major changes in *ABCA1* mRNA levels were observed compared with the control, except a slight decrease at time 4 h (Table 4).

#### Effects of antipsychotics on apoB secretion

The HepG2 cell line has been shown to be model of choice for studying human apoB synthesis and secretion (30). Once we demonstrated that lipid synthesis was increased by effect of antipsychotics and, in some cases, especially after their removal, we sought to determine whether antipsychotics affect apoB secretion. In previous experiments, we confirmed that apoB100 secretion was specific, as the MTP inhibitor CP-346086 (10  $\mu$ M) almost completely abolished the appearance of apoB100 in the medium (data not show).

TABLE 4. Effects of antipsychotics on lipid-metabolism-related gene expression

	Control	Haloperidol	Clozapine	Risperidone	Ziprasidone
<i>SREBF2</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.038				
2 h	0.823 $\pm$ 0.069	1.124 $\pm$ 0.074**	1.254 $\pm$ 0.062**	1.045 $\pm$ 0.038*	1.192 $\pm$ 0.070**
4 h	0.911 $\pm$ 0.061	1.460 $\pm$ 0.101**	1.081 $\pm$ 0.041*	1.041 $\pm$ 0.108	1.186 $\pm$ 0.065**
16 h	0.517 $\pm$ 0.055	0.854 $\pm$ 0.059**	0.743 $\pm$ 0.099*	0.545 $\pm$ 0.071	0.588 $\pm$ 0.065
16 h+8 h	0.734 $\pm$ 0.040 <sup>++</sup>	0.958 $\pm$ 0.084*	0.869 $\pm$ 0.024**	0.695 $\pm$ 0.029 <sup>+</sup>	0.828 $\pm$ 0.051 <sup>+</sup>
<i>HMGR</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.052				
2 h	0.806 $\pm$ 0.061	1.086 $\pm$ 0.082**	1.209 $\pm$ 0.029***	1.048 $\pm$ 0.054**	1.075 $\pm$ 0.057**
4 h	0.659 $\pm$ 0.050	1.294 $\pm$ 0.101***	1.206 $\pm$ 0.051***	0.814 $\pm$ 0.020**	0.832 $\pm$ 0.040**
16 h	0.263 $\pm$ 0.014	0.525 $\pm$ 0.038***	0.746 $\pm$ 0.037***	0.245 $\pm$ 0.011	0.447 $\pm$ 0.035**
16 h+8 h	0.300 $\pm$ 0.020	0.354 $\pm$ 0.019 <sup>++</sup>	0.659 $\pm$ 0.014**** <sup>+</sup>	0.369 $\pm$ 0.012*** <sup>++</sup>	0.235 $\pm$ 0.011*** <sup>+++</sup>
<i>LDLR</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.026				
2 h	0.748 $\pm$ 0.035	0.978 $\pm$ 0.046**	1.355 $\pm$ 0.078***	1.022 $\pm$ 0.046**	1.185 $\pm$ 0.040***
4 h	0.548 $\pm$ 0.022	1.104 $\pm$ 0.081***	1.313 $\pm$ 0.035***	0.708 $\pm$ 0.012***	0.770 $\pm$ 0.018***
16 h	0.448 $\pm$ 0.020	0.474 $\pm$ 0.044	0.685 $\pm$ 0.032***	0.337 $\pm$ 0.021**	0.297 $\pm$ 0.012***
16 h+8 h	0.600 $\pm$ 0.059 <sup>+</sup>	0.552 $\pm$ 0.020 <sup>+</sup>	0.869 $\pm$ 0.024*** <sup>++</sup>	0.715 $\pm$ 0.051 <sup>+++</sup>	0.400 $\pm$ 0.015*** <sup>+</sup>
<i>SREBF1</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.015				
2 h	1.021 $\pm$ 0.017	1.228 $\pm$ 0.044**	0.964 $\pm$ 0.032	0.962 $\pm$ 0.011	0.967 $\pm$ 0.032
4 h	0.737 $\pm$ 0.027	0.930 $\pm$ 0.029**	1.474 $\pm$ 0.075***	1.150 $\pm$ 0.028***	0.976 $\pm$ 0.021***
16 h	0.840 $\pm$ 0.034	0.741 $\pm$ 0.021*	0.928 $\pm$ 0.028*	0.876 $\pm$ 0.014	0.955 $\pm$ 0.037*
16 h+8 h	0.882 $\pm$ 0.023	0.715 $\pm$ 0.015***	0.914 $\pm$ 0.013	0.776 $\pm$ 0.028 <sup>++</sup>	0.689 $\pm$ 0.019*** <sup>+++</sup>
<i>FASN</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.018				
2 h	0.933 $\pm$ 0.023	1.200 $\pm$ 0.044***	1.035 $\pm$ 0.012**	0.918 $\pm$ 0.033	1.018 $\pm$ 0.018**
4 h	0.704 $\pm$ 0.022	1.357 $\pm$ 0.135**	1.026 $\pm$ 0.057**	0.909 $\pm$ 0.018***	0.877 $\pm$ 0.013***
16 h	0.476 $\pm$ 0.021	0.467 $\pm$ 0.046***	0.744 $\pm$ 0.035***	0.462 $\pm$ 0.016	0.595 $\pm$ 0.013**
16 h+8 h	0.451 $\pm$ 0.020	0.457 $\pm$ 0.016 <sup>+++</sup>	0.580 $\pm$ 0.024*** <sup>++</sup>	0.468 $\pm$ 0.019	0.352 $\pm$ 0.028*** <sup>+++</sup>
<i>ABCA1</i> 0 h	1.000 $\pm$ 0.050				
2 h	1.026 $\pm$ 0.054	1.200 $\pm$ 0.031**	1.013 $\pm$ 0.048	1.048 $\pm$ 0.053	1.046 $\pm$ 0.011
4 h	1.130 $\pm$ 0.039	0.986 $\pm$ 0.040*	1.111 $\pm$ 0.065	1.017 $\pm$ 0.107*	0.885 $\pm$ 0.035**
16 h	0.938 $\pm$ 0.061	0.955 $\pm$ 0.030	0.914 $\pm$ 0.060	0.888 $\pm$ 0.052	0.907 $\pm$ 0.025
16 h+8 h	1.007 $\pm$ 0.043	1.051 $\pm$ 0.049	1.042 $\pm$ 0.055	0.931 $\pm$ 0.035	1.107 $\pm$ 0.058

HepG2 cells were cultured in lipoprotein-deficient serum-containing medium. At time 0, the medium was supplemented with LDL (30  $\mu$ g/ml of cholesterol) and the different antipsychotics or placebo (control). The cells were incubated for 2, 4, or 16 h or for 16 h plus an additional 8 h (16 h + 8 h) after the medium was replaced by plain medium. At the indicated times, cells were collected, total mRNA was extracted, and individual mRNA species were quantified by qRT-PCR. Expression levels were normalized to Rplp0 mRNA. Expression is presented as means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. Statistical comparisons are shown versus control (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001) or each 16 h antipsychotic treatment plus 8 h of washout versus antipsychotic 16 h (<sup>+</sup> $P$  < 0.05, <sup>++</sup> $P$  < 0.01, <sup>+++</sup> $P$  < 0.001).

To investigate the effects of drug removal, we chose clozapine for its potent effect on lipid synthesis. For this, HepG2 cells were treated with clozapine (5, 10, and 25  $\mu\text{M}$ ) for 20 h. Then the medium was replaced, one set of cells continued to be exposed to clozapine (present), and the other set was incubated in medium containing no antipsychotic (washout) and  $^{35}\text{S}$ -methionine was added for 15 min, followed by 3 h chase. In cells continuously exposed to clozapine, at any dose, no significant changes in apoB100 secretion were observed compared with the control (Fig. 4A). However, when apoB100 secretion was measured after drug removal (washout), a significant increase was observed in cells pretreated with 10 and 25  $\mu\text{M}$  clozapine (Fig. 4A). No changes in the secretion of albumin, a control secretory protein, were observed among the different conditions.

In the next experiments, the effects of the other antipsychotics were investigated in the washout period. As shown in Fig. 4B, pretreatment with haloperidol (FGA) and ziprasidone and risperidone (SGAs) increased apoB100 secretion into the medium compared with the control, the differences being statistically significant even at the lowest studied dose (5  $\mu\text{M}$ ) for ziprasidone and haloperidol.

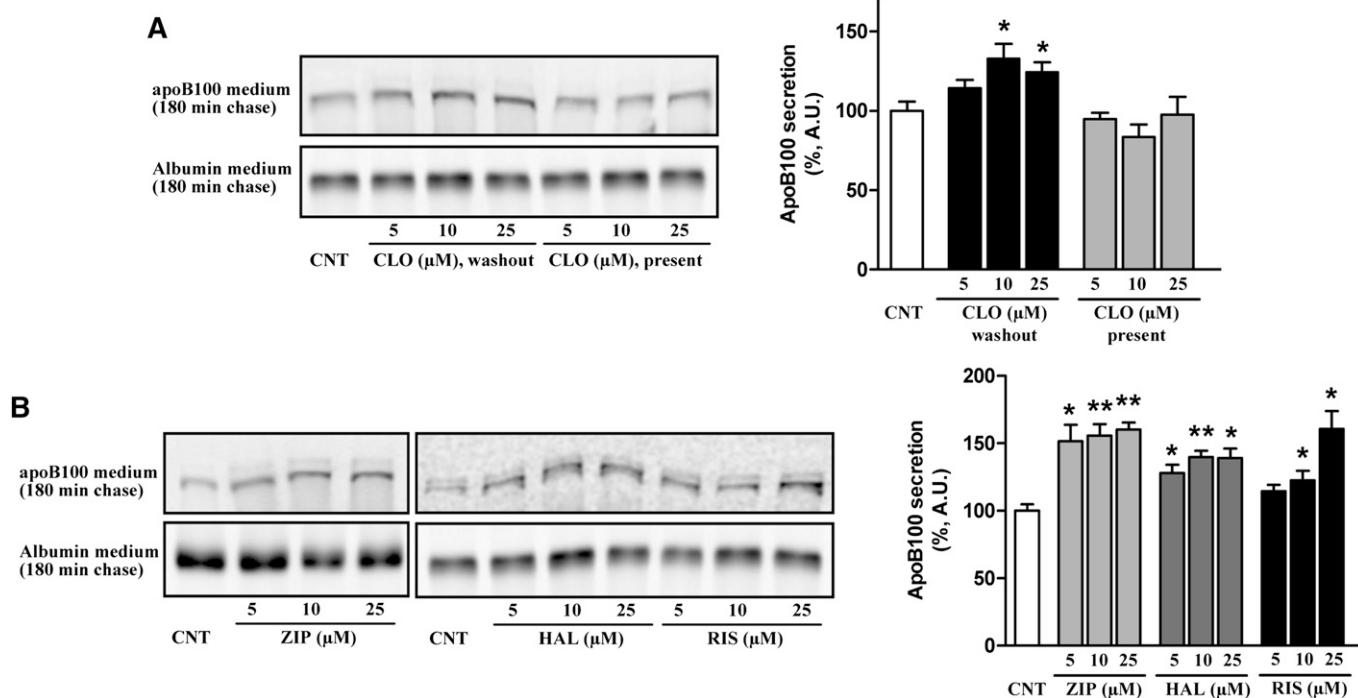
#### Effects of SGAs on the intracellular traffic of LDL-cholesterol

Antipsychotics are cationic amphiphiles with the potential to interfere with the endosomal/lysosomal pathway (16, 17).

To determine whether SGAs affect LDL-cholesterol intracellular trafficking, HepG2 cells were incubated with DiI-labeled LDL (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of cholesterol), untreated (control), or treated with the antipsychotic for 24 h, and then stained with filipin (for detection of free cholesterol) and anti-LAMP2 or anti-CD63 antibodies (lysosome markers) and examined by confocal microscopy. As shown in Fig. 5, treatment with all the antipsychotics caused an increase in bright perinuclear granules, positive for LAMP2 (Fig. 5A) and for CD63 (Fig. 5B), indicative of free sterol accumulation in the late endosome/lysosome compartment. Interestingly, filipin staining colocalized with DiI (Fig. 5), indicating that the accumulated cholesterol was derived from internalized LDL. These results show that both FGAs and SGAs interfere with the egress of free cholesterol from endosomes/lysosomes.

#### DISCUSSION

We studied the effects of SGAs on different aspects of intracellular lipid homeostasis and lipid secretion. These neuroleptics are widely used for the treatment of schizophrenia and other mental disorders, but they are not free of side effects, such as weight gain, hyperglycemia, and hypertriglyceridemia. In this context, to determine whether SGAs affect lipid metabolism, intracellular cholesterol



**Fig. 4.** Effects of antipsychotic on apoB100 secretion by HepG2 cells. Cells were treated with antipsychotics for 20 h or kept untreated (control), and then the medium was replaced by a fresh medium without or with antipsychotics and methionine. The cells were left for 1 h and then were pulse-labeled with  $^{35}\text{S}$ -methionine for 15 min, followed by a 3 h chase. At the end of the chase, the media were subjected to anti-apoB immunoprecipitation and anti-albumin as control protein. SDS-PAGE was performed and radioactivity was detected using a Typhoon 9400 PhosphorImager. A: Effects of clozapine (5, 10, and 25  $\mu\text{M}$ ) on apoB100 secretion, measured both while drug is present and after its removal (washout). B: Effects of ziprasidone, haloperidol, and risperidone (5, 10, and 25  $\mu\text{M}$ ) on apoB100 secretion measured after their removal from the medium (washout). Results from a representative experiment are shown. Bar graphs show the densitometric analysis of apoB immunoprecipitation bands (AU, arbitrary units) expressed as percentage of the control (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). Statistical comparisons are shown versus control (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ). CLO, clozapine; HAL, haloperidol; RIS, risperidone; ZIP, ziprasidone.

traffic, or lipid secretion might help to define the consequences of antipsychotic treatment on cell physiology.

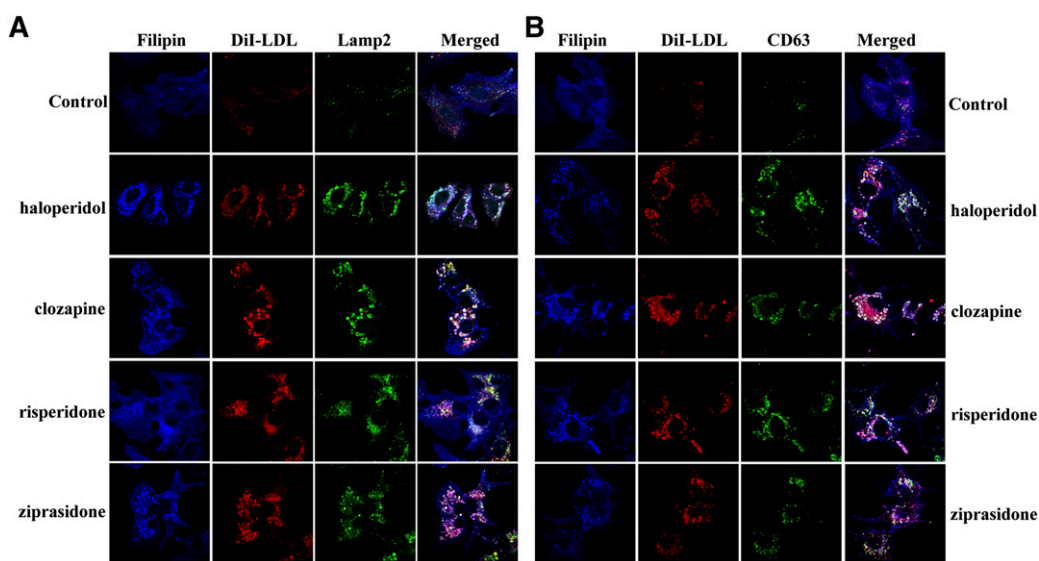
Since the pioneering observations by Summerly and Yardley (14), who demonstrated that haloperidol administration in rats resulted in the inhibition of incorporation of radiolabeled acetate into cholesterol in rat skin, interest in this field has been reborn with the introduction of SGAs, and some studies have been published recently that report seemingly controversial results on the effects of antipsychotics on cholesterol biosynthesis (15–19). We report here that SGAs (clozapine, risperidone, and ziprasidone) inhibit cholesterol biosynthesis and produce changes in the sterol composition of cells. Assuming that feedback mechanisms are triggered by the decrease in intracellular cholesterol levels, these results are in line with the reported activation of SREBP-2 processing and increased expression of genes involved in cholesterol biosynthesis induced by SGAs (present results and Refs. 23–25).

In both HepG2 and HL-60 cell lines, we found that several SGAs reduced the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate radioactivity into cholesterol and increased it in some cholesterol precursor sterols. Parallel changes in cell sterol composition as analyzed by GC/MS were observed. These effects varied widely depending on the drug and concentration used. Based on these changes, the affected enzymes could be estimated. In hepatoma HepG2 cells, clozapine mainly affected the reactions catalyzed by  $\Delta^{24}$ -reductase and  $\Delta^{8,7}$ -isomerase; risperidone affected the reactions catalyzed by  $\Delta^7$ -reductase and  $\Delta^{8,7}$ -isomerase; and ziprasidone affected the reactions catalyzed by  $\Delta^7$ - and  $\Delta^{14}$ -reductases. In promyelocytic HL-60 and neuroblastoma SH-SY5Y

cells, the effects of the studied SGAs were quite similar to those observed in HepG2 cells. Clozapine was less active in inhibiting cholesterol biosynthesis and affected both  $\Delta^{24}$ -reductase and  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, based on the increases in the C24-unsaturated sterols, zymosterol and zymostenol (substrates of  $\Delta^{8,7}$ -isomerase), respectively. Risperidone clearly inhibited  $\Delta^7$ -reductase and less strongly inhibited  $\Delta^{8,7}$ -isomerase and  $\Delta^{14}$ -reductase. In addition, ziprasidone strongly inhibited  $\Delta^{14}$ -reductase and  $\Delta^7$ -reductase, and it inhibited  $\Delta^{8,7}$ -isomerase less.

In light of these changes in intermediary sterols, ziprasidone and risperidone, two of the SGAs studied, affected  $\Delta^7$ -reductase >  $\Delta^{8,7}$ -isomerase = C<sup>5</sup>-desaturase >  $\Delta^{14}$ -reductase, which is similar to haloperidol, used as a reference FGA. Thus, these SGAs apparently have the same targets as haloperidol in the inhibition of cholesterol biosynthesis, although with different relative activities: ziprasidone > haloperidol > risperidone. In contrast, clozapine mainly increased C24-unsaturated sterols (desmosterol,  $\Delta^{7,24}$ -cholestadienol, and zymosterol), indicative of  $\Delta^{24}$ -reductase inhibition, and to a minor extent, it also affected  $\Delta^{8,7}$ -isomerase.

Differences in the cholesterol biosynthesis activity among the different cell lines used merit some comment. HepG2 and SH-SY5Y cells had a relatively high content of cholesterol, about 36–37  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell protein, whereas in HL-60 cholesterol content is just 11  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell protein. Regarding intermediates, HL-60 and SH-SY5Y had appreciable 7DHC, whereas HepG2 had undetectable 7DHC but contained some desmosterol. These profiles suggest that  $\Delta^7$ -reductase activity may be limiting in HL-60 and SH-SY5Y cells but not in HepG2 cells. Treatment with 5  $\mu\text{M}$  haloperidol strongly inhibited  $\Delta^7$ -reductase activity in all cell lines,



**Fig. 5.** Effects of antipsychotics on endosome/lysosome accumulation of LDL. Untreated HepG2 cells (control) and cells treated for 24 h with haloperidol, clozapine, risperidone, and ziprasidone 10  $\mu\text{M}$  were incubated with DiI-LDL (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of cholesterol). A: At the end of the incubation period, cells were fixed and stained with filipin and LAMP2 and then photographed using a confocal microscope. B: At the end of the incubation period, cells were fixed and stained with filipin and CD63 and then photographed using a confocal microscope. Results from a representative experiment of three independent experiments are shown.

but the levels 7DHC differed greatly among the cell lines: in HL-60 and SH-SY5Y, they reached 12–14  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , whereas in HepG2, only 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  cell protein. Moreover, in the former cell type, the increase in 7DHC was such that the total sterol content increased over the control, even though the cholesterol content decreased. In HepG2 cells, a minor amount of sterol intermediates accumulated; therefore, the total sterol content was reduced by effect of the antipsychotic. These results illustrate that the quantitative effects of antipsychotics on the total sterol content varied among tissues, depending on the relative activity of the different enzymes involved in cholesterol biosynthesis.

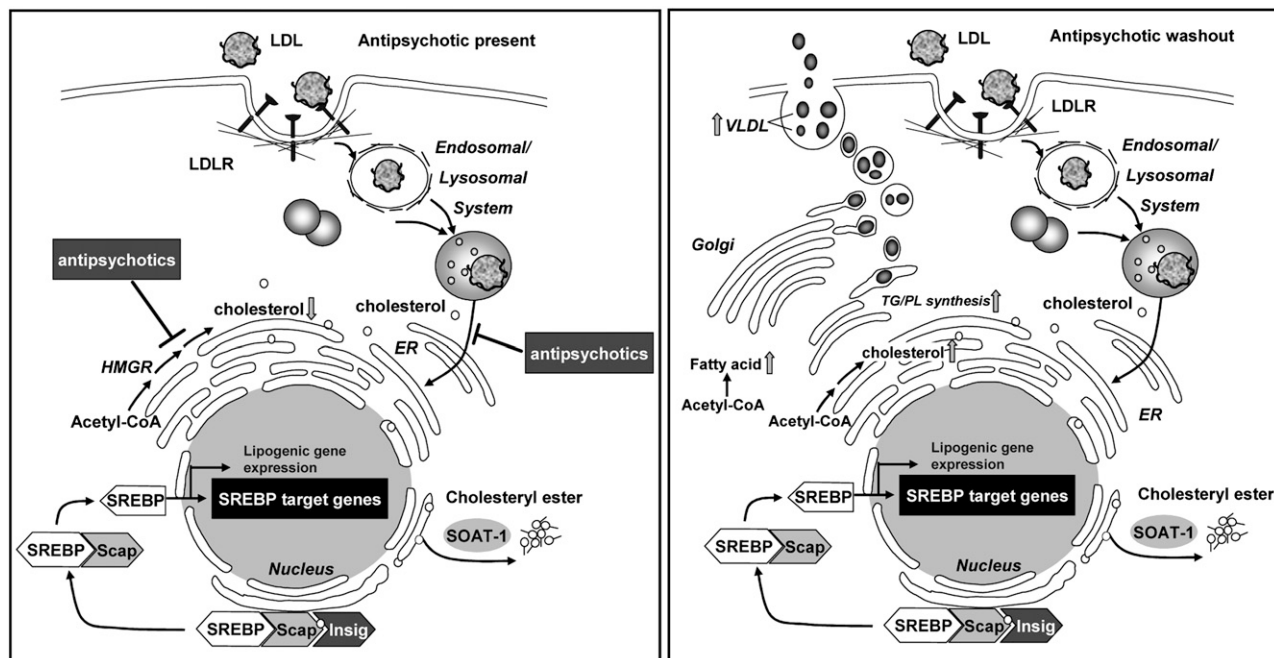
Results of the effects of antipsychotics on cholesterol biosynthesis are controversial. Silve et al. demonstrated that haloperidol binds to EBP and inhibits  $\Delta^{8,7}$ -isomerase activity in yeast (32). Kelley and Hennekam proposed, based on an increase in 7DHC plasma concentration in patients treated with haloperidol, that this antipsychotic inhibited  $\Delta^7$ -reductase (33). More recently, Kristiana et al. confirmed that both haloperidol and a panel of SGAs inhibited cholesterol biosynthesis, although the sterol intermediates accumulated and the affected enzymes were not elucidated (17). In sharp contrast, Laouressergues et al., who determined  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into cholesterol in cells 4 h after removing the antipsychotics from the culture medium, found that pretreatment with SGAs clozapine, olanzapine (18), and risperidone (19) increased rather than decreased the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -acetate into cholesterol, whereas other antipsychotics, such as haloperidol, quetiapine, and aripiprazole, had no effect (18). We addressed these seemingly contradictory results by analyzing cholesterol biosynthesis in cells during exposure to the antipsychotics and after drug withdrawal (wash-out). The results showed that shortly after antipsychotic withdrawal, the radioactivity incorporation into sterol intermediates sharply decreased while cholesterol increased, reaching values close to those in control cells not treated with the drugs. This indicates that, depending on the design of the experiment, either an inhibition or an activation of the cholesterol biosynthesis may be found.

The inhibition of both the cholesterol biosynthesis and cholesterol egress from the endosomal/lysosomal pathway likely contributed to the observed activation of SREBP-2 and subsequent overexpression of its target genes, including those involved in cholesterol biosynthesis (present results and Refs. 23–25). The increase in enzyme protein levels that would eventually take place in response to SREBP-2, however, might be counterbalanced by the inhibitory effect of these drugs on enzyme action. Hence, as long the antipsychotics are present within the cells, cholesterol biosynthesis will be inhibited. Shortly after the removal of antipsychotics, cholesterol biosynthesis is activated, likely due to both the alleviation of enzyme activity inhibition and the increased expression of enzyme proteins induced by SREBP-2. How this dual effect observed *in vitro* translates into the *in vivo* situation is not evident. More studies are required to directly examine the correspondence between the intracellular cholesterol homeostasis in relevant tissues and the eventual changes in plasma lipids in animals administered with antipsychotics.

The mechanism by which the antipsychotics affect enzyme activity is not known. The relative lack of selectivity of haloperidol, ziprasidone, and risperidone on enzyme activities is similar to that of another lipophilic, cationic amine AY9944 (supplemental Fig. II), which also inhibits  $\Delta^7$ -reductase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, and  $\Delta^{14}$ -reductase (28, 34). Enzymes acting in the last part of the cholesterol biosynthesis pathway exhibit high affinity binding for lipophilic drugs, such as AY9944, which may mimic the carbocationic high-energy intermediates involved in the reactions catalyzed by those enzymes (35). Thus, it is possible that the above-mentioned antipsychotics that are protonated under physiological conditions act similarly by mimicking the carbocationic intermediates. The causes of the differences in enzyme inhibition exhibited by clozapine are unclear. Another possibility is that antipsychotics exert their effects by altering membrane properties. Antipsychotics interact with lipids and show higher affinity for sphingomyelin than for phosphatidylcholine, and they alter liquid-ordered domain formation and bilayer thickness (36). Moreover, antipsychotics have been shown to intercalate among anionic glycerophospholipids in cellular membranes and to alter the relative spatial positioning of PLs, affecting the activity of membrane-bound proteins (37, 38).

Based on the well-known inverse relationship between cholesterol levels in the ER and SREBP-2 activation, we expected that the different antipsychotics stimulated gene expression according with their inhibition of cholesterol biosynthesis. In general, this actually was the case as ziprasidone and haloperidol, which decreased the cell cholesterol content most (Table 2), exhibited higher *SREBF2*, *HMGCR*, and *LDLR*-mRNA levels at short incubation times than did risperidone (Table 4). This relationship, however, does not stand for clozapine. It is worth mentioning that clozapine targets different enzymes on the cholesterol biosynthesis pathway than the other antipsychotics. Moreover, sterol intermediates also modulate SREBP-2 activation (39, 40). Finally, the sterol content in cell lysates as measured here may not necessarily reflect the regulatory cholesterol pool in the ER, particularly if the intracellular trafficking is impaired as in cells treated with antipsychotics.

It has been shown by others that antipsychotics, besides stimulating SREBP-2 expression, also upregulate SREBP-1 and its associated targets (FAS, SCD1, and ACC1) (17–19, 23, 41). Very recently, hypertriglyceridemia, which is independent of weight gain, induced in rats by olanzapine has been associated with the upregulation of SREBP-1-controlled lipogenic gene expression in adipose tissue (13). We thus determined mRNA levels of *SREBF1* and *FASN* in HepG2, and the results confirmed the increased expression of both genes by effect of all studied FGA and SGAs. In line with the gene expression data, a number of antipsychotics have been shown to increase the synthesis of PL, TG, and FFA both in primary hepatocytes in culture (18, 19). Moreover, acute exposure of rats to clozapine induced a pronounced increase in the content of TG, PL, and cholesterol in the liver (41). We studied the effects of antipsychotics in HepG2 cells, and the results confirm the previously published data for haloperidol, risperidone, and clozapine, and



**Fig. 6.** Scheme summarizing the changes in lipid homeostasis in cells exposed to antipsychotics (left panel, A) and after antipsychotics withdrawal (right panel, B). A: Antipsychotics inhibit the cholesterol biosynthesis and reduce the lipoprotein-derived cholesterol trafficking to the cholesterol-regulated machinery in the ER, which induces the transcription of lipogenic genes. B: Once the antipsychotics are removed from the medium and their direct actions on cholesterol biosynthesis enzymes and late-endosome cholesterol egress are relieved, the homeostatic response prevails, highly increasing the synthesis of both cholesterol and complex lipids, as well as apoB100 secretion.

they extend the study to ziprasidone, showing an increase in the synthesis of complex lipids by effect of the studied antipsychotics. Of interest, these effects were even enhanced once the drugs were removed from the incubation medium. Summarizing the results, ziprasidone was the most active during the pretreatment period, and clozapine was the most active during the washout period.

We also studied the effects of antipsychotics on apoB secretion. After the removal of the antipsychotics from the medium, a dose-dependent stimulation of apoB100 secretion was observed for all the antipsychotics studied. As TG are the main substrates regulating apoB metabolism for assembly and secretion of VLDL (42), the observed effect may be attributed to the lipid accretion antipsychotics produce.

We report here that treatment with both SGAs and haloperidol quickly (4 h) but temporarily reduce the *ABCA1* gene expression in HepG2 cells. Other authors reported increased levels of *ABCA1* mRNA in hepatocytes after treatment with haloperidol (43) and clozapine (18) for 24 h. In rats, administration of a single dose of clozapine produced a 2-fold increase of liver *ABCA1* expression at 3 h and a decrease at 12 h, stabilizing at 24 h (41). Furthermore, a decreased expression of *ABCA1* together (44) with an increased expression of *SREBF2* and their target genes (45) is also observed in Niemann Pick type C1-deficient cells, which allows us to suggest that in cells treated with antipsychotics, this profile is a response to the decreased intracellular availability of free cholesterol due to the inhibition of both cholesterol biosynthesis and the cholesterol egress for endosomes/lysosomes. To our knowledge, cholesterol efflux from cells treated with antipsychotics

has not been studied thus far. Several studies have shown decreased plasma concentration of HDL-cholesterol in subjects treated with SGAs for a long term (10, 46, 47). Whether the change in *ABCA1* gene expression induced by antipsychotics contributes to the reduction of HDL-cholesterol levels is not known; more detailed studies are required to elucidate this important issue. Another important action of antipsychotics related to intracellular lipid homeostasis is the inhibition of cholesterol egress from the late endosome/lysosome compartment. In the present study, we showed that the SGAs clozapine, risperidone, and ziprasidone, like haloperidol, all induced the accumulation of free cholesterol in endosome/lysosome vesicles, indicative of the retention of LDL-derived free cholesterol in this subcellular compartment. These results confirmed our previous findings on haloperidol (16) and extend the observations by Kristiana et al. with different atypical antipsychotics (17). Antipsychotics can be classified as hydrophobic amine or cationic amphiphile/amphipath drugs, as they are positively charged by virtue of an amine group that can be protonated, and they display both hydrophilic and hydrophobic properties. It is well recognized that many amines have a strong propensity to specifically and substantially accumulate in highly acidic intracellular compartments, such as lysosomes, through a mechanism referred to as ion trapping (48). In their unionized form, weak basic amines are relatively membrane permeable, but they are membrane impermeable in their ionized conjugate acidic state (48). Some antipsychotic and antidepressant drugs have been shown to extensively accumulate in lysosomes (49, 50).

Many cationic amphiphilic compounds, not antipsychotics, have been reported to inhibit intracellular cholesterol trafficking, such as U18666A (51–53). This effect of U18666A appears to be independent of protein synthesis, integrity of the cytoskeleton, energy availability, and pH of the lysosome (52, 54). This compound binds with high specificity to the cell membrane, and this binding can alter the organization of membrane lipids (55, 56). Interestingly, U18666A has also been shown to inhibit 2,3-oxidosqualene cyclase,  $\Delta^{8,7}$ -isomerase, and  $\Delta^{24}$ -reductase by a noncompetitive mechanism (56–58). Tamoxifen, another cationic amphiphilic drug, was shown to inhibit both LDL endocytic trafficking and the activities of sterol  $\Delta^{8,7}$ -isomerase and  $\Delta^{24}$ -reductase (21, 22). How these compounds affect the activity of enzymes located in the ER is unknown. It may be speculated that amine amphiphiles, including the antipsychotics, by intercalating in intracellular membranes, may alter the conformation of resident proteins (either enzymes or transporters), affecting their function. Further studies are needed to clarify this hypothesis.

The results of the present work and those previously reported by us and other investigators allow us to speculate on the mechanism by which cholesterol synthesis inhibition produced by antipsychotics may lead to the hypertriglyceridemia often exhibited by subjects medicated with these drugs. A scheme is shown in Fig. 6. As a result of the inhibition of several enzymes involved in cholesterol biosynthesis, antipsychotics reduce the cholesterol cell content and increase that of different intermediate sterols (present results and Refs. 15–17). Antipsychotics also inhibit the egress of lipoprotein-derived cholesterol from the endosome/lysosome compartment to the ER, further decreasing the cholesterol content in this regulatory compartment (present results and Refs. 16, 17). As a consequence, SREBP-1 and SREBP-2 are activated (17–19, 23–25, 41), and the expression of genes involved in cholesterol and fatty acid metabolisms are stimulated (present results and Refs. 17–19, 23–25, 41). As long antipsychotics are present within the cell, cholesterol biosynthesis is inhibited (present results). Once antipsychotics are removed from the medium (B), their direct actions on cholesterol biosynthesis and lipid trafficking are relieved, and the SREBP-driven homeostatic response is maximally expressed, resulting in increased synthesis of cholesterol, fatty acid, and complex lipids (present results and Refs. 18, 19). Finally, the augmented accretion of lipids may stimulate apoB100 secretion, as reported here. These effects may be relevant in the metabolic side effects of antipsychotics.

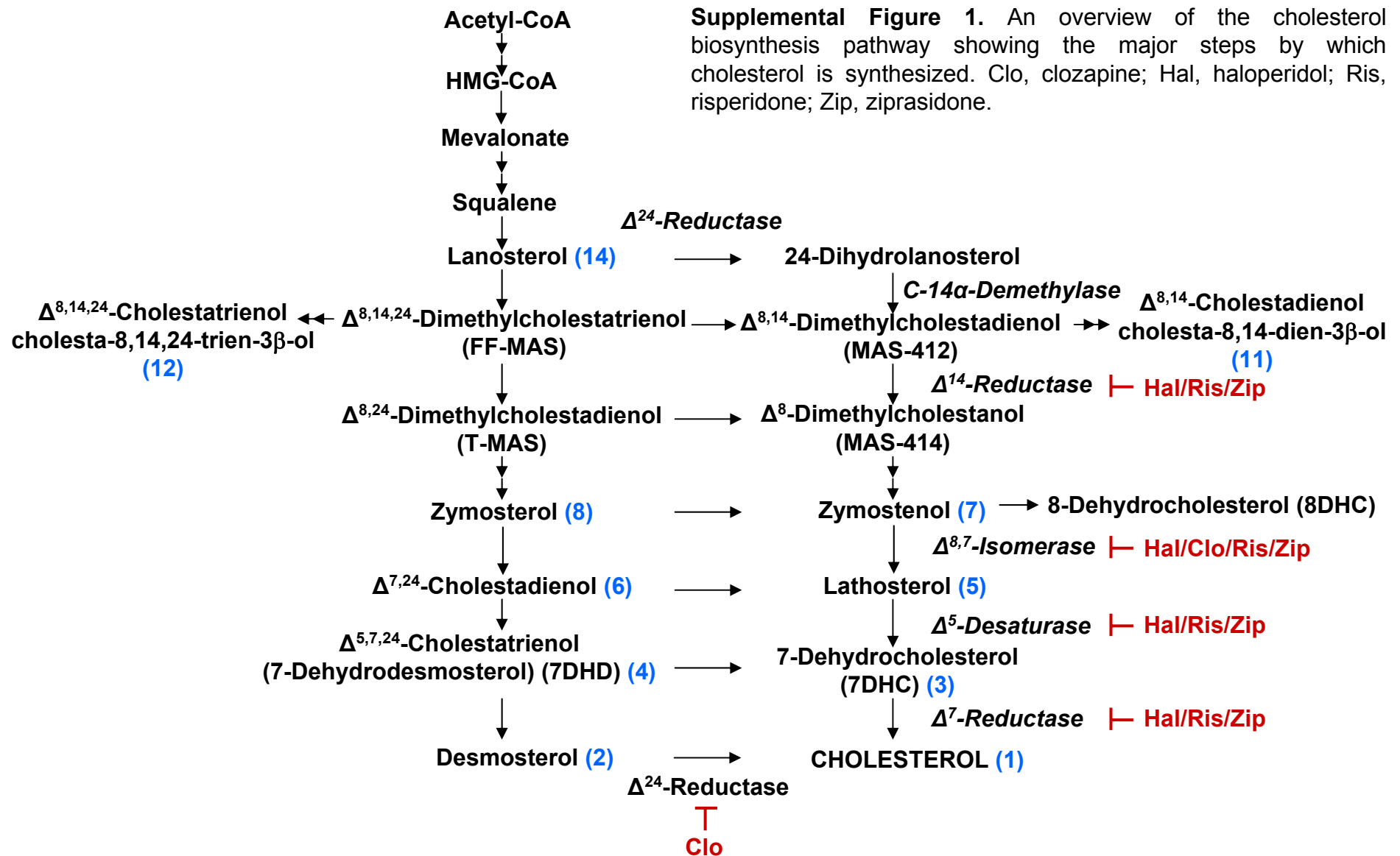
The authors thank Rafael Gonzalo-Gobernado (Microscopy Unit, IRYCIS) and Ángela Murúa for excellent technical assistance.

## REFERENCES

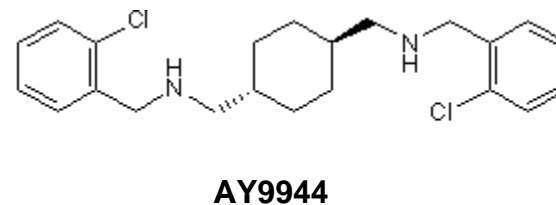
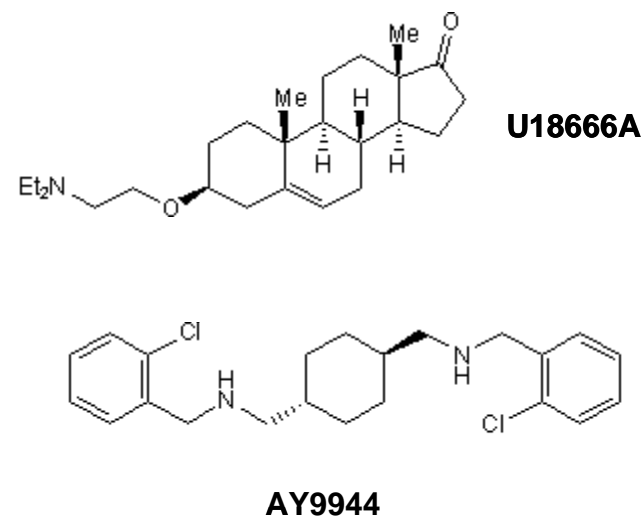
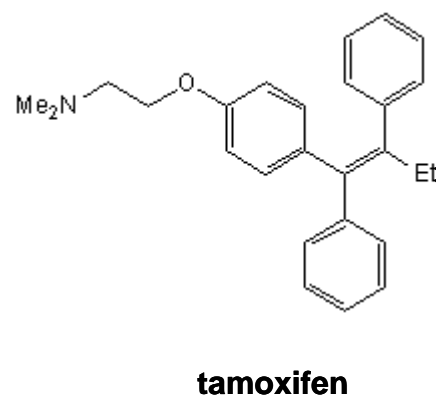
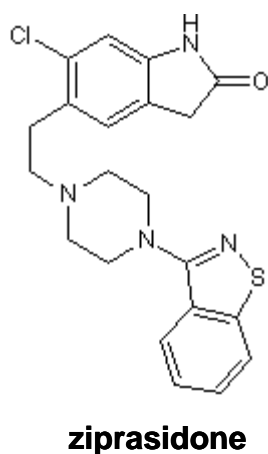
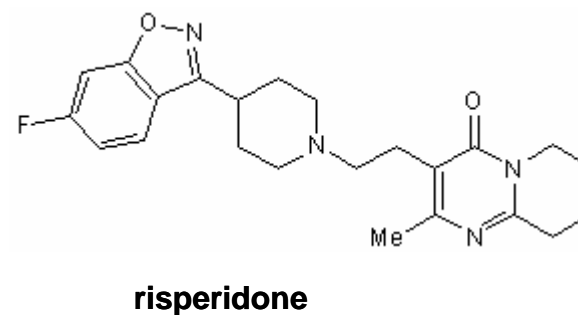
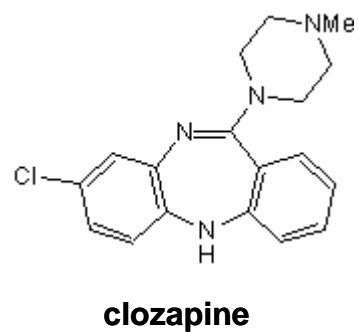
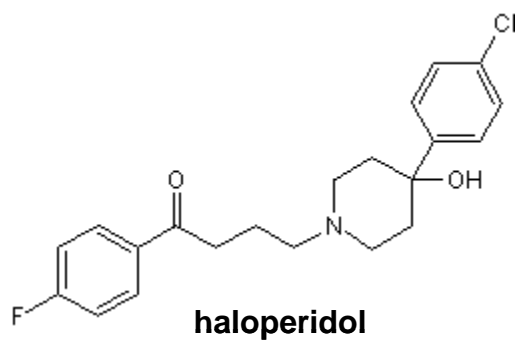
- Miyamoto, S., G. E. Duncan, C. E. Marx, and J. A. Lieberman. 2005. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry*. **10**: 79–104.
- Lieberman, J. A., T. S. Stroup, J. P. McEvoy, M. S. Swartz, R. A. Rosenheck, D. O. Perkins, R. S. Keefe, S. M. Davis, C. E. Davis, B. D.

- Lebowitz, et al. 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1209–1223.
- de Leon, J., M. T. Susce, M. Johnson, M. Hardin, L. Pointer, G. Ruano, A. Windemuth, and F. J. Diaz. 2007. A clinical study of the association of antipsychotics with hyperlipidemia. *Schizophr. Res.* **92**: 95–102.
- Gebhardt, S., M. Haberhausen, M. Heinzl-Gutenbrunner, N. Gebhardt, H. Remschmidt, J. C. Krieg, J. Hebebrand, and F. M. Theisen. 2009. Antipsychotic-induced body weight gain: predictors and a systematic categorization of the long-term weight course. *J. Psychiatr. Res.* **43**: 620–626.
- Correll, C. U. 2007. Acute and long-term adverse effects of antipsychotics. *CNS Spectr.* **12**: 10–14.
- Newcomer, J. W. 2007. Antipsychotic medications: metabolic and cardiovascular risk. *J. Clin. Psychiatry*. **68**(Suppl 4): 8–13.
- Meyer, J. M., V. G. Davis, J. P. McEvoy, D. C. Goff, H. A. Nasrallah, S. M. Davis, G. L. Daumit, J. Hsiao, M. S. Swartz, T. S. Stroup, et al. 2008. Impact of antipsychotic treatment on nonfasting triglycerides in the CATIE Schizophrenia Trial phase I. *Schizophr. Res.* **103**: 104–109.
- Meyer, J. M., and C. E. Koro. 2004. The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review. *Schizophr. Res.* **70**: 1–17.
- Lindenmayer, J. P., P. Czobor, J. Volavka, L. Citrome, B. Sheitman, J. P. McEvoy, T. B. Cooper, M. Chakos, and J. A. Lieberman. 2003. Changes in glucose and cholesterol levels in patients with schizophrenia treated with typical or atypical antipsychotics. *Am. J. Psychiatry*. **160**: 290–296.
- Correll, C. U., P. Manu, V. Olshanskiy, B. Napolitano, J. M. Kane, and A. K. Malhotra. 2009. Cardiometabolic risk of second-generation antipsychotic medications during first-time use in children and adolescents. *JAMA*. **302**: 1765–1773.
- Smith, R. C., J. P. Lindenmayer, Q. Hu, E. Kelly, T. F. Viviano, J. Cornwell, S. Vaidyanathaswamy, S. Marcovina, and J. M. Davis. 2010. Effects of olanzapine and risperidone on lipid metabolism in chronic schizophrenic patients with long-term antipsychotic treatment: a randomized five month study. *Schizophr. Res.* **120**: 204–209.
- Vik-Mo, A. O., A. B. Birkenaes, J. Ferno, H. Jonsdottir, O. A. Andreassen, and V. M. Steen. 2008. Increased expression of lipid biosynthesis genes in peripheral blood cells of olanzapine-treated patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **11**: 679–684.
- Skrede, S., J. Ferno, M. J. Vazquez, S. Fjaer, T. Pavlin, N. Lunder, A. Vidal-Puig, C. Dieguez, R. K. Berge, M. Lopez, et al. 2012. Olanzapine, but not aripiprazole, weight-independently elevates serum triglycerides and activates lipogenic gene expression in female rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **15**: 163–179.
- Summerly, R., and H. J. Yardley. 1965. The effect of a substituted fluorobutyrophenone (haloperidol) on the metabolism of sterols in rat skin. *Biochem. J.* **96**: 30.
- Sánchez-Wandelmer, J., A. M. Hernández-Pinto, S. Cano, A. Dávalos, G. de la Peña, L. Puebla-Jiménez, E. Arilla-Ferreiro, M. A. Lasunción, and R. Busto. 2009. Effects of the antipsychotic drug haloperidol on the somatostatinergic system in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **110**: 631–640.
- Sánchez-Wandelmer, J., A. Dávalos, G. de la Peña, S. Cano, M. Giera, A. Canfrán-Duque, F. Bracher, A. Martín-Hidalgo, C. Fernández-Hernando, M. A. Lasunción, et al. 2010. Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*. **167**: 143–153.
- Kristiana, I., L. J. Sharpe, V. S. Catts, L. H. Lutze-Mann, and A. J. Brown. 2010. Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol. *Pharmacogenomics J.* **10**: 396–407.
- Lauresergues, E., B. Staels, K. Valeille, Z. Majd, D. W. Hum, P. Duriez, and D. Cussac. 2010. Antipsychotic drug action on SREBPs-related lipogenesis and cholesterologenesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **381**: 427–439.
- Lauresergues, E., F. Martín, A. Helleboid, E. Bouchaert, D. Cussac, R. Bordet, D. Hum, G. Luc, Z. Majd, B. Staels, et al. 2011. Overweight induced by chronic risperidone exposure is correlated with overexpression of the SREBP-1c and FAS genes in mouse liver. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **383**: 423–436.
- Lange, Y., J. Ye, and T. L. Steck. 1998. Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**: 18915–18922.
- Kedjoui, B., P. de Medina, M. Oulad-Abdelghani, B. Payre, S. Silvente-Poirot, G. Favre, J. C. Faye, and M. Poirot. 2004. Molecular

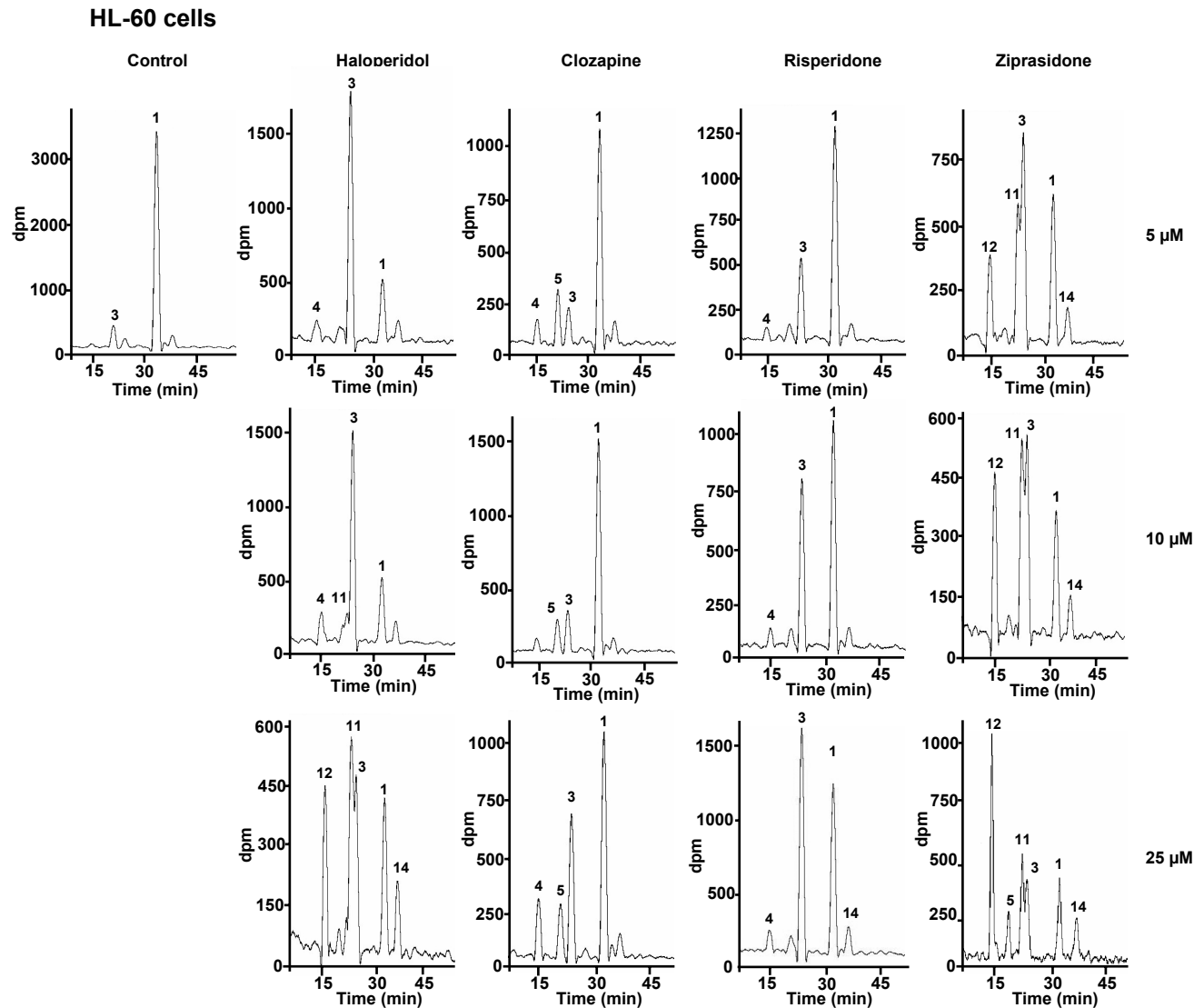
- characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J. Biol. Chem.* **279**: 34048–34061.
22. Suárez, Y., C. Fernández, D. Gómez-Coronado, A. J. Ferruelo, A. Dávalos, J. Martínez-Botas, and M. A. Lasunción. 2004. Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc. Res.* **64**: 346–355.
  23. Ferno, J., M. B. Raeder, A. O. Vik-Mo, S. Skrede, M. Glambeek, K. J. Tronstad, H. Breilid, R. Lovlie, R. K. Berge, C. Stansberg, et al. 2005. Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: a novel mechanism of action? *Pharmacogenomics J.* **5**: 298–304.
  24. Ferno, J., S. Skrede, A. O. Vik-Mo, B. Havik, and V. M. Steen. 2006. Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci.* **7**: 69.
  25. Polymeropoulos, M. H., L. Licamele, S. Volpi, K. Mack, S. N. Mitkus, E. D. Carstea, L. Getoor, A. Thompson, and C. Lavedan. 2009. Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **108**: 134–142.
  26. Martínez-Botas, J., A. J. Ferruelo, Y. Suárez, C. Fernández, D. Gómez-Coronado, and M. A. Lasunción. 2001. Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim. Biophys. Acta.* **1532**: 185–194.
  27. Calvo, D., D. Gómez-Coronado, Y. Suárez, M. A. Lasunción, and M. A. Vega. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* **39**: 777–788.
  28. Fernández, C., M. Martín, D. Gómez-Coronado, and M. A. Lasunción. 2005. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J. Lipid Res.* **46**: 920–929.
  29. Giera, M., F. Plossl, and F. Bracher. 2007. Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids.* **72**: 633–642.
  30. Meex, S. J., U. Andreo, J. D. Sparks, and E. A. Fisher. 2011. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J. Lipid Res.* **52**: 152–158.
  31. Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**: 1125–1131.
  32. Silve, S., P. H. Dupuy, C. Labit-Lebouteiller, M. Kaghad, P. Chalou, A. Rahier, M. Taton, J. Lupker, D. Shire, and G. Loison. 1996. Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**: 22434–22440.
  33. Kelley, R. I., and R. C. Hennekam. 2000. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Med. Genet.* **37**: 321–335.
  34. Tuck, S. F., H. Patel, E. Safi, and C. H. Robinson. 1991. Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol biosynthesis downstream of lanosterol. *J. Lipid Res.* **32**: 893–902.
  35. Rahier, A., and M. Taton. 1996. Sterol biosynthesis: strong inhibition of maize delta 5,7-sterol delta 7-reductase by novel 6-aza-B-homosteroids and other analogs of a presumptive carbocationic intermediate of the reduction reaction. *Biochemistry.* **35**: 7069–7076.
  36. Alves, I., G. Staneva, C. Tessier, G. F. Salgado, and P. Nuss. 2011. The interaction of antipsychotic drugs with lipids and subsequent lipid reorganization investigated using biophysical methods. *Biochim. Biophys. Acta.* **1808**: 2009–2018.
  37. Oruch, R., E. Hodneland, I. F. Pryme, and H. Holmsen. 2008. Psychotropic drugs interfere with the tight coupling of polyphosphoinositide cycle metabolites in human platelets: a result of receptor-independent drug intercalation in the plasma membrane? *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 2165–2176.
  38. Oruch, R., A. Lund, I. F. Pryme, and H. Holmsen. 2010. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.* **3**: 67–88.
  39. Fitzky, B. U., F. F. Moebius, H. Asaoka, H. Waage-Baudet, L. Xu, G. Xu, N. Maeda, K. Kluckman, S. Hiller, H. Yu, et al. 2001. 7-Dehydrocholesterol-dependent proteolysis of HMG-CoA reductase suppresses sterol biosynthesis in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz/RSH syndrome. *J. Clin. Invest.* **108**: 905–915.
  40. Rodriguez-Acebes, S., P. de la Cueva, C. Fernandez-Hernando, A. J. Ferruelo, M. A. Lasuncion, R. B. Rawson, J. Martinez-Botas, and D. Gomez-Coronado. 2009. Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem. J.* **420**: 305–315.
  41. Ferno, J., A. O. Vik-Mo, G. Jassim, B. Havik, K. Berge, S. Skrede, O. A. Gudbrandsen, J. Waage, N. Lunder, S. Mork, et al. 2009. Acute clozapine exposure in vivo induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP, PPAR, and LXR target genes in rat liver. *Psychopharmacology (Berl.)* **203**: 73–84.
  42. Ginsberg, H. N., Y. L. Zhang, and A. Hernandez-Ono. 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Med. Res.* **36**: 232–240.
  43. Vik-Mo, A. O., J. Ferno, S. Skrede, and V. M. Steen. 2009. Psychotropic drugs up-regulate the expression of cholesterol transport proteins including ApoE in cultured human CNS- and liver cells. *BMC Pharmacol.* **9**: 10.
  44. Choi, H. Y., B. Karten, T. Chan, J. E. Vance, W. L. Greer, R. A. Heidenreich, W. S. Garver, and G. A. Francis. 2003. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoaliphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* **278**: 32569–32577.
  45. Garver, W. S., D. Jelinek, J. N. Oyarzo, J. Flynn, M. Zuckerman, K. Krishnan, B. H. Chung, and R. A. Heidenreich. 2007. Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse. *J. Cell. Biochem.* **101**: 498–516.
  46. Perez-Iglesias, R., B. Crespo-Facorro, J. A. Amado, M. T. Garcia-Unzueta, M. L. Ramirez-Bonilla, C. Gonzalez-Blanch, O. Martinez-Garcia, and J. L. Vazquez-Barquero. 2007. A 12-week randomized clinical trial to evaluate metabolic changes in drug-naive, first-episode psychosis patients treated with haloperidol, olanzapine, or risperidone. *J. Clin. Psychiatry.* **68**: 1733–1740.
  47. Albaugh, V. L., R. Singareddy, D. Mauger, and C. J. Lynch. 2011. A double blind, placebo-controlled, randomized crossover study of the acute metabolic effects of olanzapine in healthy volunteers. *PLoS ONE.* **6**: e22662.
  48. Goldman, S. D., R. S. Funk, R. A. Rajewski, and J. P. Krise. 2009. Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis.* **1**: 1445–1459.
  49. Daniel, W. A., and J. Wojcikowski. 1997. Contribution of lysosomal trapping to the total tissue uptake of psychotropic drugs. *Pharmacol. Toxicol.* **80**: 62–68.
  50. Daniel, W. A., and J. Wojcikowski. 1999. Lysosomal trapping as an important mechanism involved in the cellular distribution of perazine and in pharmacokinetic interaction with antidepressants. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **9**: 483–491.
  51. Liscum, L., and J. R. Faust. 1989. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy] androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* **264**: 11796–11806.
  52. Liscum, L. 1990. Pharmacological inhibition of the intracellular transport of low-density lipoprotein-derived cholesterol in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1045**: 40–48.
  53. Lange, Y., and T. L. Steck. 1994. Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **269**: 29371–29374.
  54. Liscum, L., and N. K. Dahl. 1992. Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **33**: 1239–1254.
  55. Underwood, K. W., B. Andemariam, G. L. McWilliams, and L. Liscum. 1996. Quantitative analysis of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **37**: 1556–1568.
  56. Cenedella, R. J. 2009. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids.* **44**: 477–487.
  57. Duriatti, A., P. Bouvier-Nave, P. Benveniste, F. Schuber, L. Delprino, G. Balliano, and L. Cattel. 1985. In vitro inhibition of animal and higher plants 2,3-oxidosqualene-sterol cyclases by 2-aza-2,3-dihydro-squalene and derivatives, and by other ammonium-containing molecules. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 2765–2777.
  58. Bae, S. H., and Y. K. Paik. 1997. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem. J.* **326**: 609–616.







**Supplemental Fig. 2.** Chemical structures of cationic amphiphiles drugs: antipsychotics (haloperidol, clozapine, risperidone and ziprasidone), tamoxifen, U18666A and AY9944.



**Supplemental Figure 3.** Effects of antipsychotics on  $^{14}\text{C}$ -acetate incorporation into sterols in HL-60 cells. The cells were treated with haloperidol, clozapine, risperidone or ziprasidone at the indicated concentrations or vehicle (control) and  $^{14}\text{C}$ -acetate for 8 h, and radioactivity incorporation into the sterols was determined by HPLC and on-line radioactivity detection. Results from a representative experiment are shown. The numbers in the figure represent: 1, cholesterol; 3, 7-dehydrocholesterol (7DHC), 4, 7-dehydrodesmosterol (7DHD); 5, lathosterol, 11, cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol; 12, cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol and 14, lanosterol. The HPLC method did not resolve between cholesterol/zymostenol and desmosterol/zymosterol. 7DHC (peak # 3) was distinguished from cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol (peak # 11) and 7DHD (peak # 4) from cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol (peak # 12) by their distinct UV-absorption spectra.

**Supplemental Table 1.** Sequence of PCR primers used in quantitative real-time PCR

<b>Gene</b>	<b>Gene Bank ID</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequence 5' &gt; 3'</b>
<i>ABCA1</i>	NM_005502.3	ABCA1 Fw	GCACTGAGGAAGATGCTGAAA
		ABCA1 Rev	AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTCA
<i>FASN</i>	NM_004104.4	FASN Fw	TACGTACTGGCCTACACCCAGA
		FASN rev	TGAACTGCTGCACGAAGAAGCATAT
<i>HMGR</i>	BC033692	HMGR Fw	GGACCCCTTTGCTTAGATGAAA
		HMGR Rev	CCACCAAGACCTATTGCTCTG
<i>LDL</i>	NG_009060	LDLR Fw	GCGAAGATGCGAAGATATCGATG
		LDLR Rev	CCGGTTGGTGAAGAAGAGGTAG
<i>RPLP0</i>	BC000087	RPLP0 Fw	CCTCATATCCGGGGGAATGTG
		RPLP0 Rev	GCAGCAGCTGGCACCTTATTG
<i>SREBF1</i>	NM_004176.4	SREBF1 Fw	GCAAGGCCATCGACTACATTC
		SREBF1 Rev	GACAGCAGTGCGCAGACTTA
<i>SREBF2</i>	NM_004599	SREBF2 Fw	CTCACCTTCCTGTGCCTCTC
		SREBF2 Rev	AGGCATCATCCAGTCAAACC

**Supplemental Table 2.** Effects of antipsychotics on the sterol content of the cell line SH-SY5Y. Cells were left untreated (control) or were treated for 24 h with 5, 10 or 25  $\mu\text{M}$  of the antipsychotic (clozapine, haloperidol, risperidone and ziprasidone). Lipids were extracted and analyzed by GC/MS. Data are shown as ng of each sterol species per mg of protein, except for those sterol species that were detectable but could not be quantified for standard lack, in his case concentration was expressed in % considering the cholesterol area as 100% (shown in brackets). “Total sterols” was calculated without considering the sterol species that could not be quantified <sup>(a)</sup>. Mean of two experiments. –, not detectable. FF-MAS, ( $\Delta^{8,14,24}$ -dimethylcholestatrienol), T-MAS ( $\Delta^{8,24}$ -dimethylcholestadienol), MAS-414 ( $\Delta^8$ -dimethylcholestanol), MAS-412 ( $\Delta^{8,14}$ -dimethylcholestadienol). Dihydrolanosterol, zymosterol and desmosterol were not detectable in the SH-SY5Y samples.

ng sterol/mg protein	CONTROL	HALOPERIDOL			CLOZAPINE			RISPERIDONE			ZIPRASIDONE		
		5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$
<b>lanosterol</b>	32	32	–	50	32	–	31	60	44	–	53	68	93
<b>FF-MAS</b>	–	143	227	199	–	–	–	45	30	30	576	593	651
<b>MAS-412</b>	–	111	–	216	–	–	–	–	–	–	398	411	465
<b>cholesta-8,14,24-trienol</b>	–	(1.34)	(3.07)	(3.35)	–	–	–	–	–	–	(3.48)	(6.49)	(5.73)
<b>cholesta-8,14-dienol</b>	271	4184	8999	13893	–	–	–	437	118	104	9325	13943	12361
<b>T-MAS</b>	43	–	–	–	35	35	69	–	–	–	–	–	–
<b>MAS-414</b>	155	64	57	–	97	89	77	–	–	–	–	–	–
<b>zymosterol</b>	–	1002	1322	1160	259	302	261	–	–	–	–	–	–
<b>8-dehydrocholesterol</b>	135	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b><math>\Delta^{7,24}</math>-cholestadienol</b>	–	–	–	–	–	–	–	(1.59)	(1.85)	–	–	–	–
<b>lathosterol</b>	1938	2227	1251	663	1569	1650	860	904	916	626	357	205	186
<b>7-dehydrodesmosterol</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>7-dehydrocholesterol</b>	5702	14286	6952	4642	5692	4789	3626	10066	8092	7339	4123	2807	3141
<b>cholesterol</b>	36821	27569	26372	23243	29981	27725	17240	26793	26432	25552	24421	23368	23792
<b>TOTAL STEROLS</b>	45097	49618 <sup>a</sup>	45180 <sup>a</sup>	44066 <sup>a</sup>	37665	34590	22164	38305 <sup>a</sup>	35632 <sup>a</sup>	33651	39253 <sup>a</sup>	41395 <sup>a</sup>	40689 <sup>a</sup>

## **Curcumin promotes exosomes/microvesicles secretion which attenuates lysosomal cholesterol traffic impairment**

*Alberto Canfrán-Duque<sup>1</sup>, Óscar Pastor<sup>2</sup>, Rocío Quintana-Portillo<sup>1</sup>, Milagros Lerma<sup>2</sup>, Gema de la Peña<sup>1</sup>, Antonia Martín-Hidalgo<sup>1,3</sup>, Carlos Fernández-Hernando<sup>4</sup>, Miguel A. Lasunción<sup>1,3,\*</sup> and Rebeca Busto<sup>1,3,\*</sup>*

<sup>1</sup>Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Bioquímica-Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRyCIS, Madrid, Spain

<sup>3</sup>CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), ISCIII, Spain

<sup>4</sup>Marc and Ruti Bell Vascular Biology and Disease Program, Leon H. Charney Division of Cardiology, Departments of Medicine and Cell Biology, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA

**Correspondence:** Rebeca Busto and Miguel A. Lasunción, Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Km 9,100, Madrid, E-28034, Spain

**E-mail:** rebeca.busto@hrc.es and miguel.a.lasuncion@hrc.es.

**Fax:** +34-913369016

**Abbreviations:** **ABCA1**, ATP binding cassette protein A1; **ApoA1**, apolipoprotein A1; **CAD**, cationic amphiphilic drug; **DiI**, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; **DMSO**, dimethyl sulfoxide; **ER**, endoplasmic reticulum; **FACS**, fluorescence-activated cell sorting; **FBS**, fetal bovine serum; **GC/MS**, gas chromatography mass spectrometry; **LDL**, low-density lipoprotein; **LPDS**, lipoprotein deficient serum; **MVB**, multivesicula bodies; **NPC**, Niemann-Pick type C; **SERCA**, sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase; **SREBP**, sterol regulatory element-binding protein.

**Scope:** Exosomes/microvesicles are originated from multivesicular bodies which allow the secretion of endolysosome components out of the cell. In the present work we investigated the effects of curcumin, a polyphenol, on exosomes/microvesicles secretion in different cells lines, using U18666A as a model of intracellular cholesterol trafficking impairment.

**Methods and results:** In both HepG2 hepatocarcinoma cells and THP-1 differentiated macrophages, treatment with curcumin affected the size and the localization of endosome/lysosomes accumulated by U18666A, and reduced the cholesterol cell content. To ascertain the mechanism, we analyzed the incubation medium. Curcumin stimulated the release of cholesterol and the lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase enzyme, as well as the exosome markers, flotillin-2 and CD63. Electron microscopy studies demonstrated the presence of small vesicles similar to exosomes/microvesicles in the secretion fluid. These vesicles harbored CD63 on their surface, indicative of their endolysosomal origin. These effects of curcumin were particularly intense in cells treated with U18666A.

**Conclusion:** These findings indicate that curcumin ameliorates the U18666A-induced endolysosomal cholesterol accumulation by shuttling cholesterol and presumably other lipids out of the cell via exosomes/microvesicles secretion. This action may contribute to the potential of curcumin in the treatment of lysosomal storage diseases.

**Keywords:** Cationic amphiphilic drugs / Cholesterol / Curcumin / Exosomes / Intracellular lipid traffic / U18666A

## 1 Introduction

Cholesterol is an essential molecule in animals and, accordingly, cells tightly regulate cholesterol levels by a feedback pathway that controls the synthesis *de novo*, esterification, and uptake of exogenous cholesterol *via* lipoprotein uptake as well as its efflux [1]. Low-density lipoprotein (LDL) is the major circulating cholesterol-carrying particle in humans. After receptor-mediated endocytosis, the LDL particle is degraded in lysosomes to liberate free (unesterified) cholesterol, which is then transported to other intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum (ER). The cholesterol that reaches the ER can be esterified as a storage form of cholesterol, and it is sensed by the sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-Scap-Insig system thus triggering a homeostatic response [1].

Cell cholesterol levels and intracellular distribution are fairly constant in physiological conditions. The failure of cholesterol homeostasis is involved in numerous diseases, such as atherosclerosis, metabolic syndrome and type 2 diabetes [2]. Cholesterol removal is imperative for cholesterol homeostasis and serves to prevent over-accumulation of esterified cholesterol in cells. A major way to remove excessive cholesterol from cells is the efflux to apolipoprotein A1 (ApoA1) mediated by ABCA1, a member of the ABC protein family located in the plasma membrane [3,4].

U18666A (3- $\beta$ -[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one) is an amphiphilic amino-steroid widely used to block the intracellular cholesterol trafficking from the late endosomal/lysosome compartment to the ER [5]. In many ways, U18666A-induced lipid traffic breakdown mimics Niemann-Pick type C (NPC) disease, a hereditary lysosomal storage disease (see review by [6]). The ability of U18666A and other cationic amphiphilic drugs (CADs) to induce accumulation of lysosomal non esterified cholesterol is well documented [5-10].

Exosomes/microvesicles are nanovesicles (50-100 nm) secreted by a

variety of cell types, either constitutively or upon activation. They are generated by inward budding of the late endosomal membranes, which gives rise to intraluminal vesicles within late endosomes [11]. After accumulation of intraluminal vesicles, these compartments are termed multivesicular bodies (MVB). MVB can fuse with the plasma membrane to discharge their intraluminal vesicles as exosomes/microvesicles into the extracellular space [11]. Exosomes/microvesicles are involved in numerous processes including cell-cell communication by horizontal transfer of proteins, lipids, and RNA, antigen presentation, tumour metastasis, propagation of infectious agents, and release of superfluous membranes and cytosol [12]. It has been suggested that exosomes/microvesicles have a role in the release of lipids outside the cells [13-15].

Curcumin is the main active polyphenol extracted from the rhizome of *Curcuma longa* which has been shown to exert multiple effects on inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis [16]. Particularly, curcumin affects lipid homeostasis/metabolism [17-19], stimulating cholesterol efflux mediated by ABCA1 [20,21] and reducing cellular cholesterol accumulation [19,21]. Furthermore, it has been reported that curcumin, by elevating cytosolic calcium levels, alleviates the NPC phenotype [22]. However, the potential effects of curcumin on exosomes/microvesicles release have not been examined thus far.

Here we show that treatment of cells with curcumin resulted in exosomes/microvesicles release that can shuttle cholesterol out of the cell. In cells treated with U18666A, a model of intracellular trafficking blocking, curcumin partially abolished the late-endosome/lysosome trapping of cholesterol.

## 2 Materials and Methods

All chemicals, unless otherwise stated, were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Tres Cantos, Madrid, Spain).

## 2.1 Cell culture

HepG2 hepatocarcinoma cells (ATCC HB-8065) (Rockville, MD, USA) were cultured in DMEM high glucose (Gibco, Life Technologies Corporation, Madrid, Spain) supplemented with MEM non essential amino acids, 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (Gibco) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. THP-1 monocytes (ATCC TIB-202) were cultured in RPMI-1640 (Gibco) medium with L-glutamine supplemented with 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 10% FBS and antibiotics at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For THP-1 monocytes differentiation, cells at 5x10<sup>5</sup> cells/ml were treated with 1.6x10<sup>-7</sup>M phorbol myristate acetate in RPMI-1640 with 10% FBS for 72 h, this medium was then replaced with fresh medium for a further 48 h, after which time the cells were considered fully differentiated into macrophages [23]. Lipoprotein-deficient serum (LPDS) was prepared from FBS by ultracentrifugation at a density of 1.21 kg/L. For the experiments, the cells were cultured in medium with 10% LPDS supplemented with LDL (30 µg/ml of cholesterol), and treated or not (control) with U18666A (5 µM) (Tocris, Bristol, UK), for 22 h. Then, the cells were washed twice with PBS and serum-free medium was added, supplemented or not U18666A, curcumin (30 µM) and thapsigargin (1 µM) (Tocris), as indicated, and incubation was continued for 2 h. Due to its potential toxicity, thapsigargin was added 1 h before ending the incubation. Drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; final concentration in the medium, 0.044%). Human LDL was isolated as described elsewhere [24]. Human LDL was labeled with the fluorescent probe DiI (1,1'-Diocetadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate, Life Technologies Corporation) as previously described [25]. Cell viability was determined using XTT assays (cell proliferation kit; Roche, Mannheim, Germany).

## 2.2 Immunofluorescence microscopy

Cells were cultured on glass coverslips, and fixed with 4% paraformaldehyde/PBS for 5

min. Next, the cells were permeabilized in 0.1% triton X-100/PBS for 5 min and incubated with 2% bovine serum albumin in PBS for 45 min. For free cholesterol staining, cells were exposed to filipin (50 mg/L in PBS) for 45 min. Anti-LAMP2 (Abcam, Cambridge, UK) or anti-CD63 (BD Biosciences, Madrid, Spain) were used at a 1:200 dilution for 2 h, followed by incubation with Alexa fluor-conjugated antibodies IgG (Life Technologies Corporation) in PBS at a 1:500 dilution for 45 min. Cells were mounted for microscopy and examined on a Nikon D Eclipse C1 Confocal Microscope. Diameter analysis was performed using NIS elements Version 3.21 software (Nikon).

## 2.3 DiI-LDL uptake by flow cytometry

DiI-LDL uptake was performed as previously described [8]. The cells were treated incubated in the presence of DiI-LDL (30 µg cholesterol/ml) and then analyzed on FACScan (BD Biosciences). Non-specific uptake was determined in extra tubes containing a 50-fold excess of unlabelled LDL. The results are expressed in terms of specific median intensity of fluorescence (M.I.F.) after subtracting the autofluorescence of cells incubated in the absence of DiI-LDL.

## 2.4 Cholesterol efflux assays

LDL was labeled with [<sup>3</sup>H]-cholesterol (Perkin-Elmer, Madrid, Spain) following a previously published method [26] with minor modifications. Two ml of LDL (5 mg/ml) in 0.9% ClNa was added to [<sup>3</sup>H]-cholesterol (200 µCi; dried with N<sub>2</sub>) and incubated at 4°C for 5-7 h with occasional mixing. Cells in the medium with 10% LPDS were incubated with [<sup>3</sup>H]-cholesterol labeled LDL (60 µg/ml of cholesterol) for 22 h and treated or not (control) with 5 µM U18666A. The cells were then washed twice with PBS and cultured 2 additional hours in serum-free medium and treated or not again with U18666A, in the presence or not of curcumin or thapsigargin (last 1 h). The culture medium was harvested and the cell monolayer was washed with PBS and treated with 0.1 M NaOH to extract total

cell [<sup>3</sup>H] radioactivity. The cholesterol efflux was calculated as the percent of [<sup>3</sup>H]-cholesterol released into the medium.

## 2.5 Analysis of sterols by GC/MS

Extracted sterols were analyzed by GC/MS as previously described [9,10]. Sterols were analyzed using an Agilent 6890N GC and an Agilent 5975 MS detector (Agilent Technologies, Las Rozas, Madrid, Spain) with an Agilent DB-5ms, 30 m x 0.25 mm x 0.1 μm column. For quantitation purposes the MS detector was operated in selective ion monitoring (SIM) mode following at least one quantifier and two qualifying ions for each sterol. Peak identification was achieved both by comparison with known external standards and by monitoring their characteristic.

## 2.6 Exosomes/microvesicles preparation and analysis

Exosomes/microvesicles were prepared following the described method [27]. Briefly, after treating the cells ( $5 \times 10^6$ ), the medium was collected on ice, centrifuged at 800 x g for 10 min to sediment cells and then 12,000 x g for 30 min to sediment debris. Exosomes/microvesicles were sedimented from the remaining supernatant by ultracentrifugation at 100,000 x g for 2 h. The exosome pellet was resuspended in PBS.

The amount of late endosome exocytosis was quantitated by measuring the activity of β-N-acetylglucosaminidase (β-hexosaminidase), a lysosomal enzyme, in the medium of THP-1 macrophages or HepG2 cells using the β-N-acetylglucosaminidase assay kit. Enzyme activity was also measured in the lysed cells to calculate the total enzyme activity. Enzyme released into the medium was expressed as a percentage of the total.

Western blot analysis was performed as previously described [9]. In general, lysates were loaded at 20-30 μg, while exosomes/microvesicles samples were loaded with as much volume in gel wells as possible. Samples were run on 8–10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio Rad Laboratories S.A., Barcelona, Spain). After

blocking, the blots were probed with specific antibodies followed by incubation with secondary antibodies conjugated to IRDye 800CW or IRDye 680LT (LI-COR, Lincoln, NE, USA) in the dark. The membranes were analyzed using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR). Densitometric analysis was performed by using the Quantity One 4.5.2 version program (Bio-Rad). Antibodies used were for flotillin-2 (BD Biosciences), calnexin (Abcam), CD63 and actin (Santa Cruz Biotechnology).

## 2.7 Electron microscopy

Exosomes/microvesicles preparations were fixed in 2% paraformaldehyde and loaded onto Formvar® carbon coated grids (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA). Then, the exosomes/microvesicles were post-fixed in 1% glutaraldehyde, washed, contrasted in 2% uranyl acetate, embedded in a mixture of uranyl acetate (0.8%) and methyl cellulose (2%), and examined in a JEOL JEM1010 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

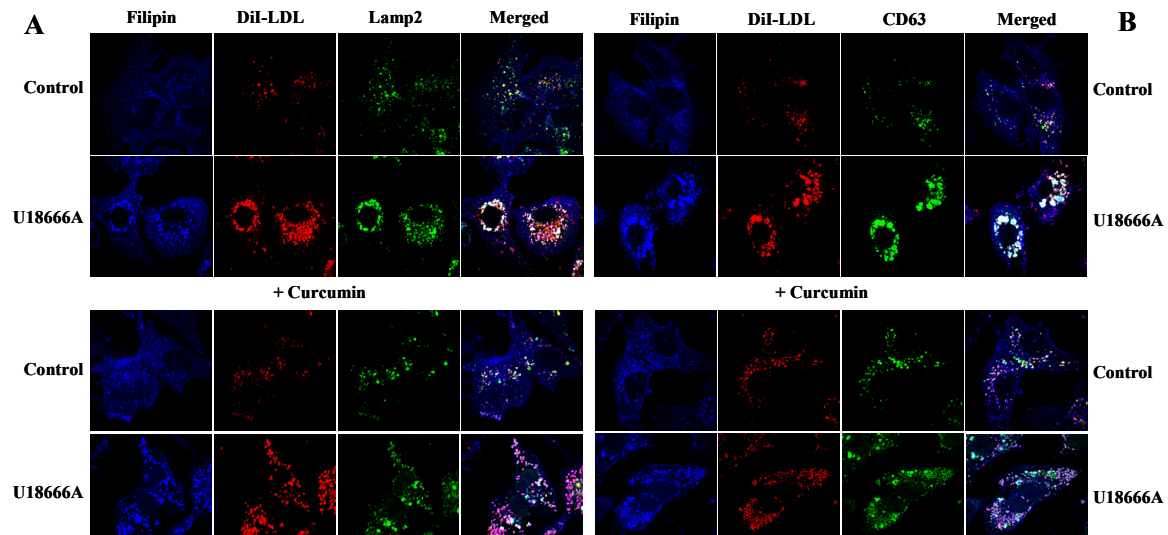
## 2.9 Exosomes/microvesicles bead fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Exosomes/microvesicles obtained from THP-1 macrophages incubated in the presence of DiI-LDL, were absorbed onto 4 μm aldehyde-sulfate latex beads (Invitrogen, Life Technologies Corporation) and incubated with CD63 antibody (BD Biosciences) followed by secondary antibody, washed and analyzed on a FACSscan (BD Biosciences) as previously described [28].

## 2.10 Statistical Analysis

Data are shown as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using a 2-tailed, unpaired Student's *t*-test. The difference between 2 sets of values was considered significant when the *P* value was <0.05.





**Figure 1.** Effects of curcumin on the intracellular distribution of LDL in cells treated with U18666A. HepG2 cells were exposed to DiI-LDL (30  $\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) for 24 h in the absence (control) or the presence of 5  $\mu\text{M}$  U18666A for a total of 24 h. Where indicated, during the last 2 h, cells were treated with 30  $\mu\text{M}$  curcumin. The cells were then washed, fixed and stained with filipin and LAMP2 (A) or CD63 (B) and analyzed using a confocal microscope. Results from a representative experiment of 3 independent experiments are shown.

### 3 Results

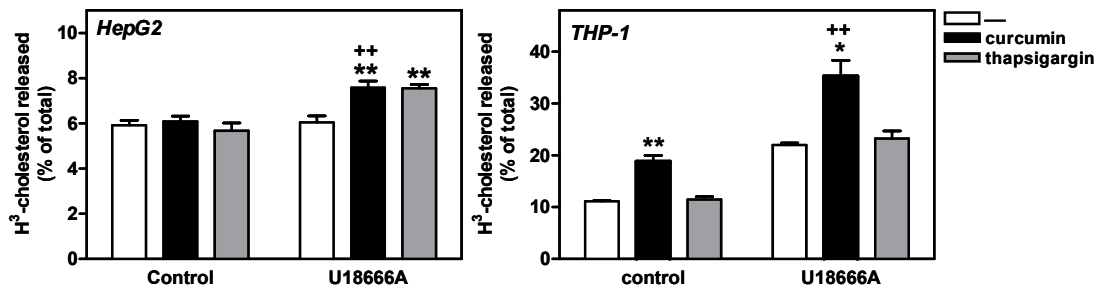
#### 3.1 Effects of curcumin on the intracellular LDL-cholesterol traffic blocked by U18666A

We analyzed the effects of curcumin in both hepatocellular carcinoma HepG2 cells and differentiated THP-1 macrophages treated with U18666A, a chemical that blocks the intracellular cholesterol trafficking [5]. Effects were compared with those of thapsigargin, which is known to stimulate exosome release [29,30].

Preliminary experiments were performed to select the doses of curcumin and thapsigargin (data not shown). Even though short incubation periods were selected, we determined whether the different drugs used affected cell viability of HepG2 cells and THP-1 macrophages. Treatment of cells without (control) or with 5  $\mu\text{M}$  U18666A for 24 h in the presence or not of 30  $\mu\text{M}$  curcumin (last 2 h) or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (last 1 h) had no appreciable effect on cell proliferation as measured by the XTT assay (Supplemental Fig. 1). For comparison, 5% DMSO was used as a control of high cellular toxicity [31]. To visualize the endocytic pathway, we incubated HepG2 cells and THP-1 macrophages with DiI-labeled LDL (30

$\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) in the absence (control) or the presence of U18666A for 24 h and for the last 2 h with 30  $\mu\text{M}$  curcumin as indicated. At the end of the incubation, cells treated with U18666A showed increased filipin staining in bright perinuclear granules, which were positive for LAMP2 (Fig. 1A) and CD63 (Fig.1B and supplemental Fig. 2), indicative of free sterol accumulation in the late endosome/lysosome compartment. Filipin staining co-localized with DiI (Fig.1 and supplemental Fig. 2), indicating that accumulated free cholesterol derives from internalized LDL. These results confirmed that U18666A interferes with the egress of free cholesterol from endosomes/lysosomes as previously reported by others [5,7].

When cells challenged with U18666A were further treated with curcumin for the last 2 h of incubation, a decrease in the size of granules positive for DiI, filipin and LAMP2 or CD63 was observed (Fig. 1 and supplemental Fig. 2). In HepG2 cells, diameters ( $\mu\text{m}$ ) of DiI-filipin-LAMP2-positive granules were the following (means  $\pm$  SEM): Control,  $1.12 \pm 0.03$ ; Curcumin,  $1.25 \pm 0.03$ ; U18666A,  $2.59 \pm 0.04$  ( $p < 0.0001$  versus Control); U18666A + curcumin,  $1.36 \pm 0.03$  ( $p < 0.0001$  versus U18666A). In differentiated THP1 cells: Control,  $1.04 \pm 0.03$ ; Curcumin,  $0.94 \pm 0.02$



**Figure 2.** Curcumin increases LDL-derived cholesterol efflux in cells treated with U18666A. HepG2 cells (A) and THP-1 differentiated macrophages (B) were exposed to <sup>3</sup>H-cholesterol labeled LDL (60 µg/ml of cholesterol) for 22 h in the absence (control) or the presence of 5 µM U18666A. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30 µM curcumin or 1 µM thapsigargin (last 1 h), as indicated. Finally, <sup>3</sup>H-radioactivity was measured in both the cells and medium. The <sup>3</sup>H-cholesterol efflux into the medium is expressed as the percentage of total radioactivity in the well (cells plus medium). Results are mean ± SEM of three independent experiments performed in duplicate. Statistical comparisons are shown versus control or U18666A, respectively (\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ) or versus control + curcumin (+  $P < 0.05$  and ++  $P < 0.01$ ).

( $p < 0.001$  versus Control); U18666A,  $2.07 \pm 0.05$  ( $p < 0.0001$  versus Control); U18666A + curcumin,  $1.23 \pm 0.03$  ( $p < 0.0001$  versus U18666A). Similar results were observed for DiI-filipin-CD63-positive granules in both cell lines. Besides changes in the size of the LAMP2/CD63 positive granules, in cells treated with curcumin, abundant DiI and filipin positive vesicles appeared in the cell periphery.

To quantify DiI-LDL uptake and accumulation, cells were analyzed by flow cytometry. As expected, U18666A stimulated the uptake of DiI-LDL in HepG2 cells ( $223.9 \pm 5.8$  % of the control,  $n=3$   $p < 0.0001$  versus control). Treatment with curcumin reduced intracellular DiI by approximately 25% ( $167.0 \pm 10.5$  % of the control;  $p < 0.01$ ). Similar results were found with THP-1 macrophages (data not show). These findings indicate that curcumin promotes the elimination of LDL-DiI previously accumulated by effect of U18666A.

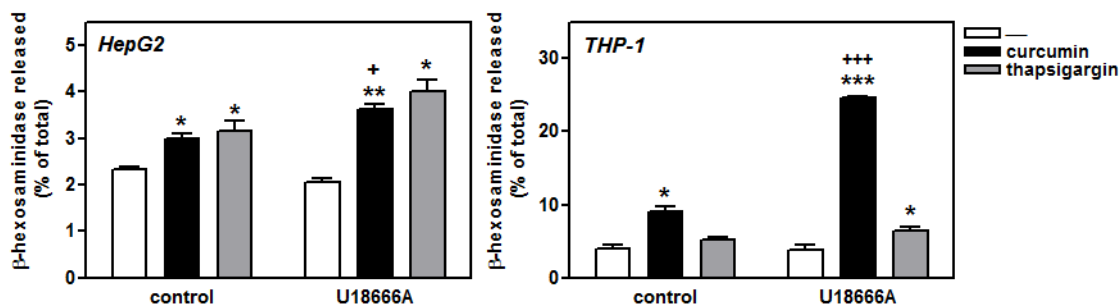
### 3.2 Effects of curcumin on cholesterol secretion

We then determined the effects of curcumin on the efflux of cholesterol from cells prelabeled with <sup>3</sup>H-cholesterol LDL. As shown in Fig. 2, in HepG2 cells, both curcumin and thapsigargin promoted cholesterol efflux outside the cells when

they were pre-treated with U18666A. In THP-1 macrophages, curcumin increased the cholesterol efflux in both control and U18666A treated cells, whereas thapsigargin was ineffective (Fig. 2). In separate experiments, we determined total cholesterol in both cells and medium at the end of the incubation. As shown in Supplemental Table 1, in cells previously treated with LDL and U18666A for 22 h, treatment with curcumin for the last 2 h significantly reduced the cholesterol cell content in both HepG2 cells and THP-1 macrophages. Treatment with thapsigargin for 1 h was less effective, the effect was statistically significant only in HepG2 cells. Given that cells were incubated in the absence of any cholesterol acceptor (i.e. ApoA1), the results suggested that in this condition curcumin may promote cholesterol efflux via pathways alternative to the classic mediated by ABCA1. Thus, we examined the possibility of exosomes/microvesicles secretion.

### 3.3 Curcumin induces the secretion of endosomal/lysosomal proteins from cells

To determine whether curcumin induces late endosome exocytosis, the culture media of HepG2 cells and THP-1 macrophages were analyzed for the presence of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase, as a



**Figure 3.** Effect of curcumin on  $\beta$ -hexosaminidase secretion into the culture medium in cells treated with U18666A. HepG2 cells (A) and THP-1 differentiated macrophages (B) were exposed to LDL (30  $\mu$ g/ml of cholesterol) in the absence (control) or the presence of 5  $\mu$ M U18666A for 22 h. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu$ M curcumin or 1  $\mu$ M thapsigargin (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, the activity of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase, was measured in both cells and medium. The enzyme activity released into the medium is expressed as the percentage of total enzyme content (cells plus medium). Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. Statistical comparisons are shown versus control or U18666A, respectively (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  and \*\*\*  $P < 0.0001$ ) or versus control + curcumin (+  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.001$  and +++  $P < 0.0001$ ).

marker of lysosome content secretion [32]. As shown in Fig. 3, there was a significant increase in  $\beta$ -hexosaminidase activity in the culture media of curcumin treated cells, both HepG2 cells and THP-1 macrophages. Thapsigargin also induced the secretion of  $\beta$ -hexosaminidase into the medium, more intensely in HepG2 than in THP-1 cells (Fig. 3).

To further characterize the secretion induced by curcumin we also measured the content of flotillin-2, a protein associated with lipid rafts and endolysosomes, and CD63, a lysosome protein, both of which are considered markers for exosomes/microvesicles [14,30,33,34]. As shown in Fig. 4, treatment of HepG2 cells and THP-1 macrophages with curcumin greatly increased the content of both flotillin-2 and CD63 in the exosomes/microvesicles fraction isolated from the incubation medium by ultracentrifugation. Thapsigargin also stimulated the secretion of both markers, especially in cells treated with U18666A (Fig. 4). No appreciable changes in the content of these proteins in cell lysates were detected (Fig. 4).

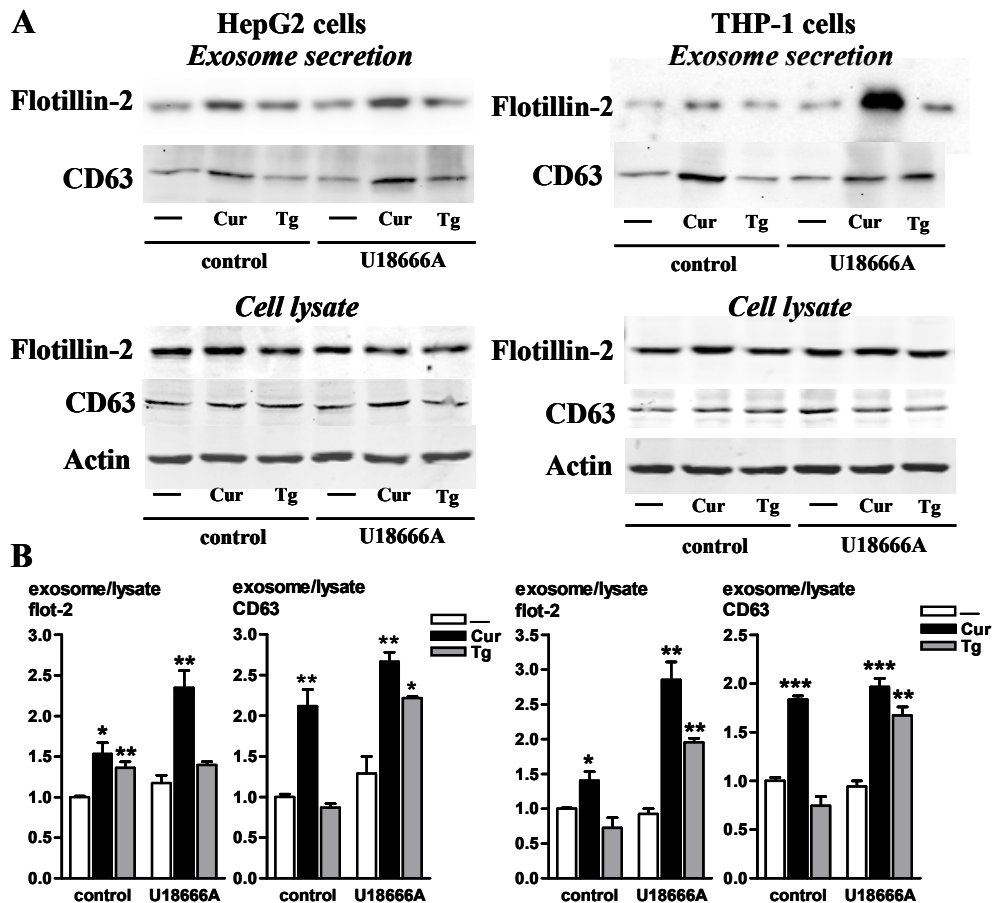
In order to evaluate the purity of the exosome/microvesicles preparations, we analyzed the presence of a RE marker, calnexin (supplemental Fig. 3). Calnexin was barely detected in the

exosomes/microvesicles whereas it was abundant in the corresponding cell lysates run in parallel.

To confirm that isolated vesicles were indeed exosomes/microvesicles, they were examined by electron microscopy (Fig. 5A). The electron micrographs of the preparations revealed rounded structures approximately 50-100 nm in size, similar to previously described exosomes/microvesicles [11,12,14,28].

Exosomes/microvesicles are too small to be reliably analyzed by direct cell sorting. To overcome this handicap, these microvesicles were fixed to aldehyde sulfate-latex beads of a size that was within the detection range of a flow cytometer [27]. By using a specific antibody against CD63, we confirmed that particles bound to the latex beads were exosomes/microvesicles, as they harbored CD63 on their surface (Fig. 5B).

We then directly quantified the secretion of exosomes/microvesicles-bound CD63 and DiI promoted by curcumin and thapsigargin. For this, THP-1 differentiated macrophages were exposed to DiI-labeled LDL and treated or not (control) with U18666A for 22 h, the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued



**Figure 4.** Curcumin enhances the release of flotillin-2 and CD63-containing exosomes/microvesicles from HepG2 cells (A) and THP-1 differentiated macrophages (B). Cells were exposed to LDL (30  $\mu$ g/ml of cholesterol) in the absence (control) or the presence of 5  $\mu$ M U18666A for 22 h. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu$ M curcumin (Cur) or 1  $\mu$ M thapsigargin (Tg) (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, the medium was removed, and the exosomes/microvesicles were isolated and analyzed by western blot. Cell lysates were also analyzed by western blot. Results from a representative experiment of 3 independent experiments are shown. A. Flotillin-2, CD63 and actin western blot in exosomes and cell lysate in HepG2 and THP1 cells. B. Quantification of exosomes/microvesicles release of flotillin-2 (flot-2) and CD63 in HepG2 and THP-1 differentiated macrophages. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments; the control without curcumin is normalized to 1. Statistical comparisons are shown versus control or U18666A, respectively (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ ).

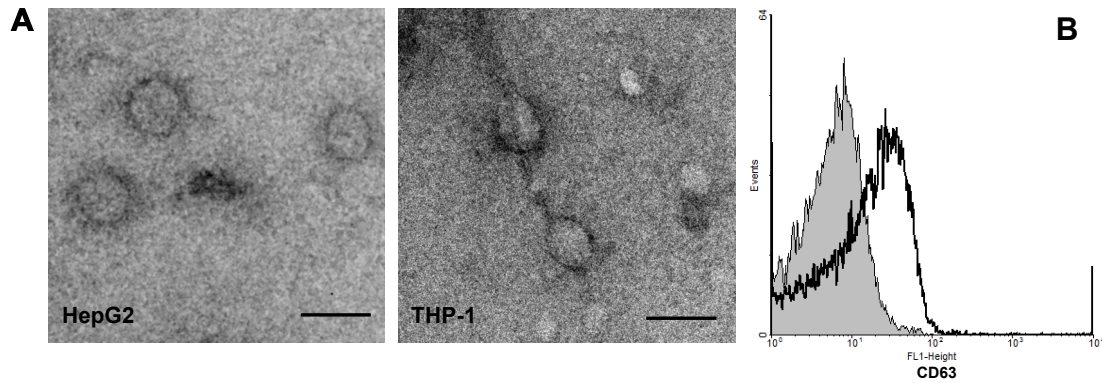
for 2 h in the presence of 30  $\mu$ M curcumin or 1  $\mu$ M thapsigargin (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, exosomes/microvesicles were isolated from the incubation medium, fixed to the latex beads and then analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 6, treatment with curcumin for the last 2 h significantly increased the release of both CD63 and DiI bound to exosomes/microvesicles in both macrophages treated in control conditions and in those treated with U18666A. Treatment with thapsigargin during the last

1 h of incubation, also promoted the release of the two markers, but the change was significant only in cells treated with the intracellular lipid traffic inhibitor (Fig. 6).

Finally, we measured the cholesterol content in exosomes/microvesicles by GC/MS. Treatment with curcumin or thapsigargin increased cholesterol content in exosomes/microvesicles isolated from the incubation media of both HepG2 cells and THP-1 differentiated macrophages, especially when cells were treated with

U18666A (Table 1). These results show that curcumin promotes exosomes/microvesicles secretion, which is a way of releasing cholesterol out of the cell and, thus, to alleviate endosomal/lysosomal cholesterol deposition caused by the inhibition of intracellular lipid traffic.

previously described [11]. Taken together, these phenotypic changes represent an amelioration of the U18666A-induced late endosome/lysosome traffic block by curcumin.



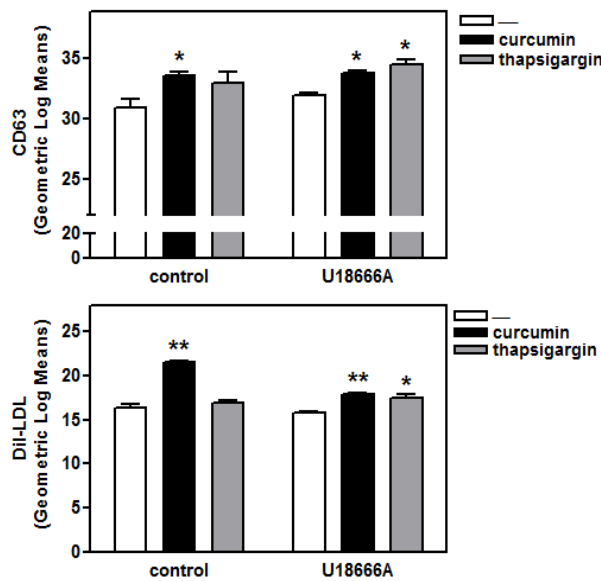
**Figure 5.** Identification and characterization of exosomes/microvesicles. Exosomes/microvesicles were isolated from the incubation medium using repeated centrifugation and ultracentrifugation. (A) Electron micrographs of exosomes/microvesicles from HepG2 cells and THP-1 differentiated macrophages. The images show small vesicles of approximately 50-100 nm in diameter. The scale bar indicates 100 nm. (B) FACS analysis of exosomes/microvesicles from THP-1 differentiated macrophages incubated with latex beads and stained with anti-CD63 (bold tracer). Filled tracer, negative control.

#### 4 Discussion

We studied the effects of curcumin on exosomes/microvesicles secretion as carriers of intracellular lipids. We hypothesized that exosomes/microvesicles could shuttle cholesterol out of the cell and relieve the late endosomal/lysosomal trapping of lipids caused by U18666A, a prototypic lysosomotropic tertiary amine that mimics many of the features of cells from subjects affected by different lysosomal storage diseases including NPC [6]. Several other CADs have been shown to induce non esterified cholesterol accumulation in lysosomes [5-10]. We show that treatment with curcumin for just 2 h decreases the size of lysosomes accumulated by effect of U18666A, in both hepatoma HepG2 cells and THP-1 differentiated macrophages. Curcumin also affected the subcellular localization of CD63, LAMP2 positive vesicles, being more peripheral, which may correspond to MVB in transit to fuse with the plasma membrane to discharge their content as exosomes/microvesicles to the medium, as

We found that curcumin promoted efficient cholesterol secretion from cells, especially but not limited to those previously treated with U18666A. Other authors have also shown the stimulation of cholesterol efflux by curcumin in different cell lines, which was attributed to the upregulation of ABCA1 [20,21]. Given that cholesterol secretion was assayed in cells incubated in a serum-free medium containing no detectable ApoA1, the contribution of the ABCA1-mediated cholesterol efflux in our experimental setting must be small. Therefore, we examined the possibility of cholesterol secretion via exosomes/microvesicles release.

It is widely reported that cells perform exosome exocytosis upon the increase of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> [29,30,35]. The sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) is one of the major mechanisms by which cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration are maintained at low levels within cells [36]. Thapsigargin, a SERCA inhibitor, has been shown to stimulate



**Figure 6.** Curcumin increases CD63 surface expression and DiI-LDL content in the exosomes/microvesicles analyzed by FACS. THP-1 differentiated macrophages were incubated with U18666A and DiI-labeled LDL (30  $\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) for 22 h. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu\text{M}$  curcumin or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (last 1 h), as indicated. Then, the exosomes/microvesicles were isolated from the medium, attached to the latex beads, labeled with CD63 and analyzed by FACS. The graphs represent the fluorescence (Geometric Log means) of CD63 (A) and DiI-LDL (B) in the exosomes/microvesicles. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical comparisons are shown versus control (\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.001$ )

exosome release by elevating cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [29]. Curcumin also elevates cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [37], all of which stimulated us to determine whether this polyphenol promotes exosomes/microvesicles secretion. Indeed, we found that, at the studied doses, curcumin stimulated cholesterol secretion more intensely than thapsigargin.

We, then, characterized the exocytic secretion. Curcumin treatment resulted in the release into the media of the

lysosomal enzyme,  $\beta$ -hexosaminidase, and the exosome markers, flotillin-2 and CD63 [14,30,32-34]. Comparatively, curcumin was as effective as thapsigargin in HepG2 cells, and even more active in THP-1 macrophages, the reasons for these differences are not evident. In any case, these results pointed to exosomes/microvesicles secretion by curcumin in any cell type. Furthermore, vesicles isolated from the incubation medium harbored CD63 on their surface, a criterion used for exosome identification [34]. Exosomes/microvesicles secreted by thapsigargin also showed these features. Finally, images obtained by electron microscopy showed the presence of small vesicles of approximately 50-100 nm in diameter, confirming that curcumin stimulated the release of exosomes/microvesicles.

Exosomes/microvesicles originate from MVB and correspond to the intraluminal vesicles [11]. In this sense, exosomes/microvesicles may be considered as a vehicle for the secretion of endosome components out of the cell, including lipids [14,38] and lipolytic enzymes [15,39]. Although the biological significance of exosomes/microvesicles was heavily questioned [40], now it is admitted that exosomes/microvesicles serve to remove obsolete membrane proteins and to act as messengers in intercellular communications [11,12]. Many cell types have been described to secrete exosomes/microvesicles [13,33,41-45], including the mouse liver *in vivo* [46].

Recently, Strauss et al. reported that both oligodendroglial cells treated with U18666A and NPC1 deficient fibroblasts secrete cholesterol-containing exosomes/microvesicles, and propose that exosomes/microvesicles release serves as a mechanism to partially bypass the intracellular cholesterol trafficking block present in those cells [14]. In our experimental conditions the effect of U18666A compared to the control was small, significant increases were only observed for the release of  $^3\text{H}$ -cholesterol in THP1 differentiated macrophages. Besides differences among the cell lines, it is to note that we used a much shorter period to study

	HepG2 Cholesterol (ng)	THP-1 Cholesterol (ng)
Control	43	93
Control + curcumin	53	173
Control + thapsigargin	78	158
U18666A	37	90
U18666A + curcumin	115	203
U18666A + thapsigargin	100	190

**Table 1. Cholesterol content in exosomes/microvesicles secreted by HepG2 and THP-1 differentiated macrophages.** Cells were incubated in the absence (control) or the presence of 5  $\mu$ M U18666A for 22 h. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu$ M curcumin or 1  $\mu$ M thapsigargin (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, exosomes/microvesicles were isolated from the medium and analyzed by GC/MS. Data are shown as ng of cholesterol in the total exosomes/microvesicles extract. Means of two experiments.

efflux – 2 h compared to 16 h in the study by Strauss et al. [14]. In any case, present results show that both curcumin and thapsigargin are more effective in stimulating exosomes/microvesicles secretion when HepG2 cells and THP-1 macrophages are challenged with U18666A.

There is an increasing interest in curcumin as a potential pharmacological agent, having been shown to exhibit anti-inflammatory, antioxidant, antimutagenic and anticarcinogenic activities [47]. As regards to lipid metabolism, curcumin reduces cholesterol levels in animal models [48], which is in line with the up-regulation of LDL receptor observed in cultured HepG2 cells [17,18]. On the other hand, curcumin reduces the uptake of oxidized LDL and promotes the efflux of cholesterol from macrophages, contributing to retard the development of atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice [21]. In the NPC1<sup>-/-</sup> mouse, curcumin has been shown to prolong the survival and

to improve the weight gain and physical activity of the animals [22]. In contrast, Borbon et al. reported a variable, but mild, increase in survival in NPC<sup>-/-</sup> mice by effect of curcumin treatment [49], which brings into question the efficacy of curcumin on neurodegeneration in this mouse model. Nevertheless, curcumin has been shown to prevent or protect against side effects induced by different CADs [50-52], and to inhibit lipid peroxidation in the brain region in different animal models [53-55]. In N-methyl *N*-nitrosourea treated mice, curcumin administration normalized the altered levels of total lipids, cholesterol and phospholipids in membrane preparations from cerebrum and cerebellum [55]. Finally, beneficial effects of curcumin have been reported in different neurologic diseases such as multiple sclerosis [56], Alzheimer's disease [57], and senescence [58]. The secretion of exosomes/microvesicles induced by curcumin shown herein, as a mechanism for the secretion of diverse materials out of the cell, may contribute to the ample variety of the potential beneficial effects of this polyphenol.

Several other mechanisms may facilitate the release of neutral lipids out of the cells, including lipoprotein secretion, lipoprotein retro-endocytosis and ABC-family protein mediated efflux. In particular, intracellular accumulation of undegraded LDL has been shown to stimulate retro-endocytosis of LDL [59]. We have not examined the effects of curcumin on these processes; therefore, the relevance of exosomes/microvesicles secretion compared to these other potential mechanisms for cholesterol release deserves further investigation.

In conclusion, present study shows that curcumin stimulates exosomes/microvesicles release, which is particularly beneficial in cells treated with U18666A, a model of intracellular cholesterol trafficking impairment. This may contribute to shuttle cholesterol and presumably other lipids out of the cell, and thus to ameliorate the endo/lysosomal cholesterol accumulation. This action of curcumin, herein shown for the first time, may contribute to the health benefits of curcumin consumption.

## References

- [1] Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 2006, *124*, 35-46.
- [2] Ikonen, E., Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol. Rev.* 2006, *86*, 1237-1261.
- [3] Ikonen, E., Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008, *9*, 125-138.
- [4] Maxfield, F. R., van Meer, G., Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2010, *22*, 422-429.
- [5] Liscum, L., Faust, J. R., The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* 1989, *264*, 11796-11806.
- [6] Cenedella, R. J., Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids* 2009, *44*, 477-487.
- [7] Lange, Y., Steck, T. L., Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J. Biol. Chem.* 1994, *269*, 29371-29374.
- [8] Suarez, Y., Fernandez, C., Gomez-Coronado, D., Ferruelo, A. J. et al., Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc. Res.* 2004, *64*, 346-355.
- [9] Sanchez-Wandelmer, J., Davalos, A., de la Pena, G. Cano, S. et al., Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 2010, *167*, 143-153.
- [10] Canfran-Duque, A., Casado, M. E., Pastor, O., Sanchez-Wandelmer, J. et al., Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro. *J. Lipid Res.* 2013, *54*, 310-324.
- [11] Ludwig, A. K., Giebel, B., Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012, *44*, 11-15.
- [12] Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem. Pharmacol.* 2011, *81*, 1171-1182.
- [13] Klein, D., Bussov, H., Fewou, S., N., Gieselmann, V., Exocytosis of storage material in a lysosomal disorder. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, *327*, 663-667.
- [14] Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Mobius, W. et al., Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 26279-26288.
- [15] Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A. et al., Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* 2010, *51*, 2105-2120.
- [16] Aggarwal, B. B., Sung, B., Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2009, *30*, 85-94.
- [17] Peschel, D., Koerting, R., Nass, N., Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J. Nutr. Biochem.* 2007, *18*, 113-119.
- [18] Dou, X., Fan, C., Wo, L., Yan, J., Qian, Y., Wo, X., Curcumin up-regulates LDL receptor expression via the sterol regulatory element pathway in HepG2 cells. *Planta Med.* 2008, *74*, 1374-1379.
- [19] Kang, Q., Chen, A. Curcumin suppresses expression of low-density lipoprotein (LDL) receptor, leading to the inhibition of LDL-induced activation of hepatic stellate cells. *Br. J. Pharmacol.* 2009, *157*, 1354-1367.
- [20] Dong, S. Z., Zhao, S. P., Wu, Z. H., Yang, J. et al., Curcumin promotes cholesterol efflux from adipocytes related to PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 passway. *Mol. Cell. Biochem.* 2011, *358*, 281-285.
- [21] Zhao, J. F., Ching, L. C., Huang, Y. C., Chen, C. Y. et al., Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2012, *56*, 691-701.
- [22] Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A. et al., Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* 2008, *14*, 1247-1255.



- [23] Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., Dockrell, D. H., The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2010, 5, e8668.
- [24] Martinez-Botas, J., Ferruelo, A. J., Suarez, Y., Fernandez, C., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A., Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1532, 185-194.
- [25] Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M. A., Vega, M. A., Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 1998, 39, 777-788.
- [26] Xu, Q., Jurgens, G., Huber, L. A., Bock, G., Wolf, H., Wick, G., Lipid utilization by human lymphocytes is correlated with high-density-lipoprotein binding site activity. *Biochem. J.* 1992, 285, 105-112.
- [27] They, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* 2006, Chapter 3, Unit 3 22.
- [28] Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., Lotvall, J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* 2007, 9, 654-659.
- [29] Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., Colombo, M. I., Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 20083-20090.
- [30] Chen, F. W., Li, C., Ioannou, Y. A., Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* 2010, 5, e15054.
- [31] Ben Trivedi, A., Kitabatake, N., Doi, E., Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54, 2961-2966.
- [32] Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., Hoflack, B., Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells. *J. Cell. Sci.* 1990, 95, 441-461.
- [33] Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D. et al., Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 5157-5166.
- [34] Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., Simpson, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, D1241-1244.
- [35] Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J., Andrews, N. W., Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 1997, 137, 93-104.
- [36] Brini, M., Carafoli, E., Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 2009, 89, 1341-1378.
- [37] Bilmen, J. G., Khan, S. Z., Javed, M. H., Michelangeli, F., Inhibition of the SERCA Ca<sup>2+</sup> pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 6318-6327.
- [38] Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L. et al., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008, 319, 1244-1247
- [39] Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S. et al., PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett.* 2004, 572, 11-14.
- [40] Couzin, J., Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* 2005, 308, 1862-1863.
- [41] van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M. et al., Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001, 121, 337-349.
- [42] Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D. et al., Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 9683-9688.
- [43] Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N. M. et al., Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J. Cell. Sci.* 2006, 119, 4486-4498.
- [44] O'Neill, H. C., Quah, B. J., Exosomes secreted by bacterially infected

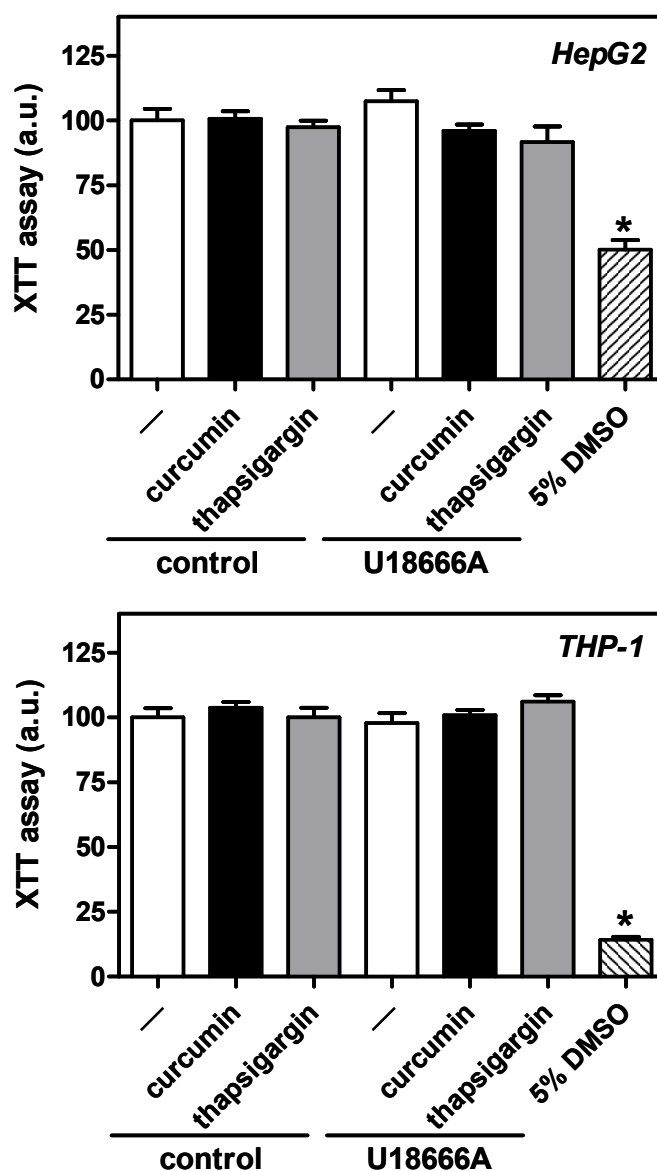
- macrophages are proinflammatory. *Sci. Signal.* 2008, 1, pe8.
- [45] Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B. et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer* 2011, 10, 117.
- [46] Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., Larusso, N. F., Exosomes in the Pathogenesis, Diagnostics and Therapeutics of Liver Diseases. *J. Hepatol.* 2013, PII: S0168-8278(13)00207-9 (doi:10.1016/j.jhep.2013.03.028).
- [47] Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B. B., Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2012, 39, 283-299.
- [48] Ramirez-Tortosa, M. C., Mesa, M. D., Aguilera, M. C., Quiles, J. L. et al., Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, 147, 371-378.
- [49] Borbon, I. A., Hillman, Z., Duran, E., Jr., Kiela, P. R., Frautschy, S. A., Erickson, R. P., Lack of efficacy of curcumin on neurodegeneration in the mouse model of Niemann-Pick C1. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012, 101, 125-131.
- [50] Bishnoi, M., Chopra, K., Kulkarni, S. K., Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2008, 88, 511-522.
- [51] El-Beshbishy, H.A., Mohamadin, A. M., Nagy, A. A., Abdel-Naim, A. B., Amelioration of tamoxifen-induced liver injury in rats by grape seed extract, black seed extract and curcumin. *Indian J. Exp. Biol.* 2010, 48, 280-288.
- [52] Sookram, C., Tan, M., Daya, R., Heffernan, S., Mishra, R. K., Curcumin prevents haloperidol-induced development of abnormal oro-facial movements: possible implications of Bcl-XL in its mechanism of action. *Synapse* 2011, 65, 788-794.
- [53] Bala, K., Tripathy, B. C., Sharma, D., Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006, 7, 81-89.
- [54] Khurana, S., Jain, S., Mediratta, P. K., Banerjee, B. D., Sharma, K. K., Protective role of curcumin on colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2012, 31, 686-697.
- [55] Singla, N., Dhawan, D. K., N-methyl N-nitrosourea induced functional and structural alterations in mice brain-role of curcumin. *Neurotox. Res.* 2012, 22, 115-126.
- [56] Natarajan, C., Bright, J. J., Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J. Immunol.* 2002, 168, 6506-6513.
- [57] Frautschy, S. A., Hu, W., Kim, P., Miller, S. A. et al., Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol. Aging* 2001, 22, 993-1005.
- [58] Sun, C. Y., Qi, S. S., Zhou, P., Cui, H. R. et al., Neurobiological and pharmacological validity of curcumin in ameliorating memory performance of senescence-accelerated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2013, 105C, 76-82.
- [59] Aulinskas, T.H., Oram, J.F., Bierman, E.L., Coetzee, G.A. et al., Retro-endocytosis of low density lipoprotein by cultured human skin fibroblasts. *Arteriosclerosis.* 1985, 5, 45-54.

*This work was supported by Grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (SAF2011-29951 and SAF2009-08764), and from the National Institutes of Health R01HL107953 and R01HL106063 (to C. Fernández-Hernando). CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of ISCIII. A. C. D. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación. R. B. is a researcher from FIBio-HRC supported by the Fondo de Investigación Sanitaria and Comunidad de Madrid.*

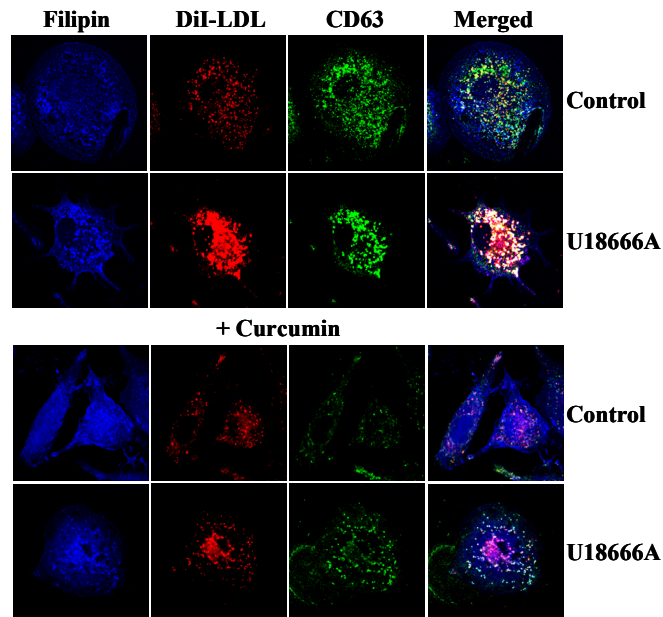
*We thank Microscopy Unit (IRyCIS) and Transmission Electron Microscopy Unit (Universidad Autónoma, Madrid, Spain) and Ángela Murúa for excellent technical assistance.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

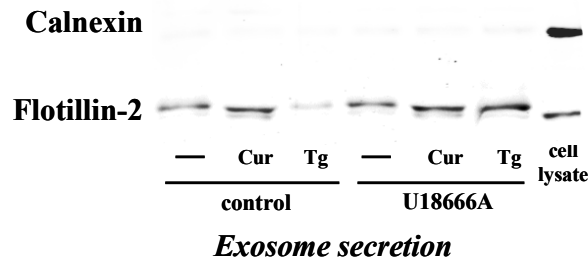
SUPPLEMENTAL FIGURES



**Supplemental Fig. 1.** Effects of the drugs used on cell viability HepG2 and THP-1 macrophages cells. Cells were exposed to LDL (30  $\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) in the absence (control) or the presence of 5  $\mu\text{M}$  U18666A and 5% DMSO for a total 24-h period. Where indicated, during the last 2 or 1 h, the cells were treated with 30  $\mu\text{M}$  curcumin or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin, respectively. Then, the mitochondrial activity (XTT assay) was measured after the treatment. Values are the mean  $\pm$  S.E.M of three independent experiments with three replicates each. Statistical comparisons are shown versus control (\*  $P < 0.05$ ).



**Supplemental Fig. 2.** Effects of curcumin on the intracellular distribution of LDL in THP-1 differentiated macrophages cells treated with U18666A. The cells were exposed to DiI-LDL (30  $\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) for 24 h in the absence (control) or the presence of 5  $\mu\text{M}$  U18666A for a total 24-h period. Where indicated, during the last 2 h, cells were treated with 30  $\mu\text{M}$  curcumin. Then, the cells were washed, fixed and stained with filipin and CD63 and analyzed using a confocal microscope.



**Supplemental Fig. 3.** Analysis of the purity of exosome/microvesicles preparations. THP-1 differentiated macrophages were exposed to LDL (30  $\mu\text{g/ml}$  of cholesterol) in the absence (control) or the presence of 5  $\mu\text{M}$  U18666A for 22 h. Then the medium was removed, cells were washed twice, and serum-free medium was added, supplemented or not (control) with U18666A, and incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu\text{M}$  curcumin (Cur) or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (Tg) (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, the medium was removed, and the exosomes/microvesicles were isolated and calnexin, a reticulum endoplasmic marker, and flotillin-2 were analyzed by western blot. In the same gel, control cell lysate was also analyzed for comparison. Results from a representative experiment of 3 independent experiments are shown.

**SUPPLEMENTAL TABLE 1**

Cholesterol content in HepG2 and THP-1 differentiated

macrophages.

	<b>HepG2</b>	<b>THP-1</b>
	<b>Cholesterol</b>	<b>Cholesterol</b>
	<b>(ng/mg protein)</b>	<b>(ng/mg protein)</b>
<b>Control</b>	23780 ± 470	81937 ± 2548
<b>Curcumin</b>	17373 ± 323**	72441 ± 892*
<b>Thapsigargin</b>	20910 ± 810*	76584 ± 1310

Cells were incubated in the presence of 5  $\mu$ M U18666A for a total of 22 h, then the medium was removed, cells were washed twice, serum-free medium was added and treated again with U18666A. The incubation was continued for 2 h in the presence of 30  $\mu$ M curcumin or 1  $\mu$ M thapsigargin (last 1 h), as indicated. At the end of the incubation, the cells were lysated, lipids were isolated and analyzed by GC/MS. Data are shown as ng of cholesterol per mg of protein. Results are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical comparisons are shown versus control (\*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ ).

