



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**EFECTO DE INHIBIDORES DE LA  
SINTESIS DE COLESTEROL SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y EL METABOLISMO  
LIPIDICO DE CELULAS TUMORALES**

**María José Bellini**

**Directora de tesis  
Prof. Dra. Margarita García de Bravo**

**Codirectora de tesis  
Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz**

**TESIS  
2003**

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. M. García de Bravo y la codirección de la Dra. María J. Tacconi de Alaniz y con el asesoramiento académico de la Dra. Laura Bakás.

**a mis padres, hermanos  
y a mis enanos.**

**Mi reconocimiento:**

**al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, en la persona de su antiguo Director, Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner y de su actual Directora Dra. María J. Tacconi de Alaniz, por haberme brindado los medios y materiales necesarios para la realización de este trabajo,**

**a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización de esta tesis,**

**a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme formado durante tantos años de estudio,**

**al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca que me otorgó oportunamente.**

## **Mi agradecimiento:**

**a Maguie, por ser no sólo una Directora, sino también una amiga, por el cariño, las charlas, los consejos, la comprensión permanente, por aceptarme sin conocerme, por enseñarme, por su respeto, por su ejemplo,**

**a “la Polo”, por ser mi compañera, mi amiga, mi consejera, por los buenos momentos, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por marcarme los errores y aceptar mis críticas, por la ayuda y la confianza,**

**a Fita, por su ayuda en la obtención de mi beca, por su apoyo incondicional en mi trabajo, por sus consejos en la escritura de esta tesis,**

**a mi “madrina”, Laura Bakás, por su afecto y apoyo,**

**a Marisa, por su colaboración técnica y su calidez,**

**a mis compañeras del cuarto piso, por ser la “nena”, por las horas compartidas,**

**a los amigos que encontré gracias a este trabajo, a Monilicu, Sasi, Claudette, Maurito, Maga, Vane, porque con todos compartí momentos de mi vida más allá del trabajo, porque me consolaron cuando estuve triste y compartieron mis alegrías, porque los quiero,**

a mis amigos de la facu y de la cátedra, Peter, Flor, Pity, por estar,

a Nico, por haber compartido conmigo tantos años y tantas cosas,

a Sulfu, porque gracias a ella estoy ahora escribiendo estos agradecimientos, gracias por darme fuerzas, por aconsejarme, por ser mi amiga,

a Tim por ser mi amigo y mi compañero, por quererme, por todo,

a mis amigas de la vida, Ceci y Sandra, por aguantarme y quererme,

a mis viejos, por darme la posibilidad de estudiar, por los retos y los mimos, por su amor,

a Ceci y a Tato, por ser los mejores hermanos del mundo y por darme el regalo más hermoso, esos tres enanos que amo,

a Juano, Luli y Buba, por ser una alegría en mi vida,

a todo el personal del INIBIOLP, a los que me aguantaron, me ayudaron y me brindaron su afecto y también a aquellos que me permitieron desarrollar mi tolerancia,

a la vida, por los momentos difíciles y los lindos, pero por sobre todo por permitirme aprender que cuando uno desea algo y se lo propone se puede conseguir.

**INDICE**

	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VI</b>
<b>CAPITULO I. INTRODUCCION</b>	
<b>I.A.GENERALIDADES</b>	<b>1</b>
<b>I.B.VIA DEL MEVALONATO O RUTA BIOSINTETICA DE ISOPRENOIDES</b>	<b>4</b>
<b>I.B.1.Regulación de la Vía. Puntos de control</b>	<b>7</b>
<b>I.C.METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS. DESATURASAS</b>	<b>13</b>
<b>I.C.1.Regulación de las desaturasas</b>	<b>15</b>
<b>I.D.INTEGRACION DEL METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS Y ESTEROLEN EN CELULAS DE MAMIFEROS</b>	<b>19</b>
<b>I.E.SINTESIS DE COLESTEROL Y DE ISOPRENOIDES NO ESTEROIDES. RELACION CON LA REPLICACION DEL ADN Y EL CICLO CELULAR</b>	<b>22</b>
<b>Síntesis de colesterol y crecimiento celular</b>	<b>22</b>
<b>Requerimientos de colesterol en el crecimiento y proliferación celular</b>	<b>23</b>
<b>Papel de los isoprenoides en la síntesis de ADN</b>	<b>24</b>
<b>Síntesis de mevalonato y cáncer</b>	<b>27</b>
<b>I.F.INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE COLESTEROL</b>	<b>28</b>
<b>I.F.1.Inhibidores competitivos de la reductasa. Estatines</b>	<b>28</b>
<b>I.F.2.Inhibidores no competitivos de la reductasa. Monoterpenos</b>	<b>32</b>
<b>I.G.OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.</b>	
<b>II.A.MATERIALES UTILIZADOS</b>	<b>37</b>
<b>II.A.1.Drogas radiactivas</b>	<b>37</b>



<b>II.A.2.Drogas no radiactivas</b>	<b>38</b>
<b>II.B.METODOLOGIA</b>	<b>41</b>
<b>II.B.1.Metodología general</b>	<b>41</b>
II.B.1.a.Obtención de lípidos totales y separación de lípidos neutros y fosfolípidos	41
II.B.1.b.Extracción de lípidos insaponificables y ácidos grasos de lípidos totales	41
II.B.1.c.Derivatización de ácidos grasos	42
II.B.1.d.Identificación de ácidos grasos de fosfolípidos por cromatografía gas-líquido	43
II.B.1.e.Identificación y cuantificación de <sup>14</sup> C-EMAG por radio GLC	43
II.B.1.f.Cuantificación de colesterol libre y ésteres de colesterol por cromatografía en capa fina (TLC)	44
II.B.1.g.Cuantificación de fósforo total	45
II.B.1.h.Separación de lípidos insaponificables radiactivos por TLC	45
II.B.1.i.Obtención de fracciones acuosas, proteicas y lipídicas de células y tejidos	45
II.B.1.j.Incorporación de <sup>3</sup> H-mevalonolactona en fracciones celulares o de tejidos	46
II.B.1.k.Obtención de la sal sódica de simvastatin	47
<b>II.B.2.Metodología específica utilizada para el cultivo de células</b>	<b>47</b>
II.B.2.a.Cultivo de células tumorales en monocapa	47
II.B.2.b.Recuento de células y estimación de la viabilidad celular	51
II.B.2.c.Determinación de proteína celular total	53
II.B.2.d.Incorporación de sustratos exógenos radiactivos	53
II.B.2.d.1.Incorporación de <sup>14</sup> C- acetato en lípidosinsaponificables y ácidos grasos de células	53
II.B.2.b.2.Incorporación de [1,2- <sup>3</sup> H]-colesterol en células A549	54
II.B.2.b.3.Incorporación de <sup>14</sup> C- ácidos grasos	54
<b>II.B.3.Metodología específica utilizada para tumor humano heterotransplantado</b>	<b>55</b>
II.B.3.a.Mantenimiento de los animales	55
II.B.3.b.Desarrollo y mantenimiento del tumor humano en ratones "nude"	58
II.B.3.c.Medida de las dimensiones tumorales	59

II.B.3.d.Obtención de microsomas de hígado y tumor	59
II.B.3.e.Ensayo de catividad $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturante	60
<b>II.B.4.Tratamiento estadístico de los resultados</b>	<b>60</b>
 <b>CAPITULO III. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE COLESTEROL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO DE CELULAS A549.</b>	
 <b>EFECTO DE INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN CELULAS NEOPLASICAS EN CULTIVO: INHIBICION DEL CRECIMIENTO CELULAR</b>	
	<b>62</b>
 <b>PRIMERA PARTE. Estudio del metabolismo lipídico en presencia del simvastatin: vía del mevalonato, relación con la síntesis de ácidos grasos</b>	
	<b>63</b>
<b>III.A.Efecto del simvastatin sobre la proliferación y viabilidad de células A549</b>	<b>63</b>
<b>III.B.Efecto del simvastatin sobre el metabolismo lipídico de células A549 en fase logarítmica de crecimiento</b>	<b>65</b>
<b>III.B.1.Contenido de colesterol y fosfolípidos. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos</b>	<b>65</b>
<b>III.B.2.Incorporación de colesterol exógeno</b>	<b>68</b>
<b>III.B.3.Incorporación de <math>^{14}\text{C}</math>-acetato en colesterol y en ácidos grasos celulares</b>	<b>70</b>
<b>III.C.Estudio de la vía del mevalonato en células A549 sometidas a tratamiento con simvastatin</b>	<b>75</b>
<b>III.D.Efecto del simvastatin sobre la captación y metabolización de ácidos grasos exógenos en células A549</b>	<b>82</b>
 <b>SEGUNDA PARTE. Estudio del metabolismo lipídico en presencia de geraniol.</b>	
	<b>89</b>
<b>III.E.Efecto del simvastatin sobre la proliferación y viabilidad de células A549</b>	<b>89</b>
<b>III.F.Efecto del geraniol sobre el metabolismo lipídico de células A549 en fase logarítmica de crecimiento</b>	<b>90</b>

<b>III.F.1. Contenido de colesterol y fosfolípidos. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos</b>	<b>90</b>
<b>III.F.2. Incorporación de colesterol exógeno</b>	<b>93</b>
<b>III.F.3. Incorporación de <sup>14</sup>C-acetato en colesterol y en ácidos grasos celulares</b>	<b>94</b>
<b>III.F.4. Captación y metabolización de ácido dihomo-<math>\gamma</math>-linolénico en células A549 tratadas con geraniol. Actividad <math>\Delta 5</math> desaturasa</b>	<b>96</b>
<b>III.G. Discusión</b>	<b>99</b>
<b>III.G.1. Efectos del simvastatin y el geraniol sobre la viabilidad y el metabolismo lipídico de células A549 en cultivo</b>	<b>99</b>
<b>III.G.2. Metabolismo de ácidos grasos en células A549 tratadas con simvastatin y geraniol</b>	<b>102</b>
<b>III.G.3. Vía del mevalonato en células A549 tratadas con simvastatin</b>	<b>105</b>
 <b>CAPITULO IV. MODELO DE TUMOR A549/RATONES INMUNO- DEFICIENTES: CARACTERIZACION Y EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO DEL HUESPED</b>	
<b>CARACTERIZACION DEL TUMOR DE PULMON HUMANO DERIVADO DE CELULAS A549 DESARROLLADO EN RATONES ATIMICOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE SIMVASTATIN Y GERANIOL</b>	<b>107</b>
<b>IV.A. Curva de crecimiento tumoral</b>	<b>107</b>
<b>IV.B. Efecto de la presencia del tumor sobre distintos aspectos del metabolismo lipídico del animal huésped</b>	<b>108</b>
<b>IV.B.1. Contenido de colesterol</b>	<b>109</b>
<b>IV.B.2. Composición de ácidos grasos de fosfolípidos</b>	<b>110</b>
<b>IV.B.3. Incorporación y metabolización de mevalonato radiactivo</b>	<b>113</b>
<b>IV.B.4. Actividad desaturante</b>	<b>118</b>

---

<b>IV.C.Efectos del simvastatin y de geraniol sobre el crecimiento tumoral y el contenido de colesterol hepático y plasmático</b>	<b>119</b>
<b>IV.D.Discusión</b>	<b>122</b>
<b>IV.D.1.Caracterización del tumor derivado de la línea celulas A549 desarrollado en ratones nude</b>	<b>122</b>
<b>IV.D.2.Metabolismo lipídico en ratones portadores de tumor</b>	<b>123</b>
IV.D.2.a.Contenido de colesterol plasmático y hepático	123
IV.D.2.b.Incorporación y metabolización de mevalonato exógeno	124
IV.D.2.c.Actividad desaturante	125
<b>IV.D.3.Efectos del simvastatin y de geraniol sobre el crecimiento tumoral y el contenido de colesterol hepático y plasmático</b>	<b>125</b>
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>132</b>

**ABREVIATURAS**

AA-CoA	acetoacetil coenzima A
ACAT	Acil-CoA:colesterol aciltransferasa
dpm:	desintegraciones por minuto
EMAG:	ésteres metílicos de ácidos grasos
FPP	farnesil pirofosfato
HMG-CoA	hidroximetilglutaril coenzima A
IPP	isopentenil pirofosfato
LDL	lipoproteínas de baja densidad plasmáticas
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
PUFAs	ácidos grasos polinosaturados
RE	retículo endoplasmático
S1P	proteasa de sitio 1
S2P	proteasa de sitio 2
SCAP	proteína activadora del clivaje de SREBPs
SCD	estearil-CoA desaturasa
SRE-1	elemento regulador de esteroides
SREBP	proteína de unión a elemento regulador de esteroides



# CAPITULO I

*INTRODUCCION*

## INTRODUCCION

### I.A.GENERALIDADES.

El colesterol fue descubierto en 1784 como componente de cálculos biliares. Estudios posteriores demostraron que este lípido anfipático de 27 carbonos, con un peso molecular de 386, está ampliamente distribuido en el reino animal, siendo un componente esencial de las membranas celulares, donde se encuentra como colesterol libre (no esterificado)

El colesterol corporal proviene de dos fuentes principales: la dieta, donde es absorbido a nivel intestinal, y la síntesis *de novo* a partir de acetato en la llamada ruta biosintética de isoprenoides o vía del mevalonato. Este último es el principal intermediario de la vía y se origina en una reacción irreversible catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa).

En animales superiores la colesterogénesis ocurre mayoritariamente en el hígado, aunque también es importante en intestino, corteza adrenal, órganos reproductivos y piel. Aunque otras células y tejidos del organismo poseen la información genética necesaria para la síntesis de colesterol no lo sintetizan en forma activa y, bajo circunstancias normales incorporan colesterol a través de las lipoproteínas de baja densidad plasmáticas (LDL) que son internalizadas por endocitosis mediada por receptores (**Goldstein y Brown, 1990**). El colesterol de las LDL se encuentra esterificado con ácidos grasos, ésteres que se forman en una reacción catalizada por enzima Acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT).

Por otra parte las células presentan distintos mecanismos para eliminar el colesterol, uno de ellos es la síntesis de ácidos biliares, que son fundamentales para la absorción de grasas en el intestino, eliminándose así parte del mismo por materia fecal. Esta síntesis es catalizada por la enzima colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa, proceso que se lleva a cabo exclusivamente en el hígado (**Russell y Setchell, 1992**). Otra manera de eliminar el colesterol libre es convertirlo en colesterol esterificado, estos ésteres de colesterol son almacenados en gotas de lípidos intracelulares o pasan a formar parte de las LDL, derivándose así hacia otras células (**Edwards y Davies, 1996**).

Tanto el contenido de colesterol celular como el plasmático es el resultado de un equilibrio dinámico, finamente ajustado, entre la síntesis, catabolismo, incorporación y derivación del mismo.

El colesterol presenta varias funciones biológicas. Como componente de membranas regula la fluidez de las mismas interaccionando con los fosfolípidos y reduciendo la movilidad de las colas de ácidos grasos. En células especializadas de mamíferos también es importante como precursor en la biosíntesis de ácidos biliares (en hepatocitos), hormonas esteroideas (en glándulas adrenales, testículos, placenta, ovarios) y 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, la forma activa de la vitamina D (en piel, hígado y riñón) (**Edwards y Davies, 1996**). Además de las múltiples funciones del colesterol *per sé*, numerosos intermediarios isoprenoides de la vía del mevalonato son incorporados en distintos productos finales que son de vital importancia para las diversas funciones celulares, algunos de ellos son: Hemo A y ubiquinona (involucrados en el transporte de electrones), dolicol (necesario para la glicosilación de proteínas), isopentenil ARNt (como isopentenil adenina presente en algunos ARN de transferencia), citoquinas en plantas que actúan como mensajeros intracelulares y proteínas isopreniladas como laminina B (que forma parte de la lámina nuclear), proteínas G (que intervienen en los procesos de señalización intracelular) y las proteínas p21<sup>ras</sup> (que regulan el crecimiento celular) (**Goldstein y Brown, 1990**).

El estudio de la vía del mevalonato y la regulación de la misma adquiere importancia por varias razones. Como ya se mencionó las propiedades biológicas de las células se ven afectadas por el contenido de colesterol (principal producto final de la vía) de sus membranas, el cual varía durante el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular (**Rao y col., 1984; Columbano y col., 1987**). Existen numerosos estudios que prueban que algunos productos derivados del mevalonato juegan un rol fundamental en la síntesis de ADN y el crecimiento y proliferación celular. La observación de que las células cancerosas presentan una síntesis descontrolada de mevalonato, y algunas líneas celulares neoplásicas muestran contenidos de colesterol muy elevados (**Coleman y Laviets, 1981**) asociada al hecho de que estos hallazgos preceden a la aparición de cáncer bajo condiciones premalignas, soportan la idea de que una colesterogénesis descontrolada podría estar involucrada en los primeros estadios de la carcinogénesis (**Quesney-Huneus**



**y col., 1983; Siperstein 1984).** La regulación de la síntesis del mevalonato presenta entonces un blanco potencial para controlar el crecimiento de las células neoplásicas.

## **I.B.VIA DEL MEVALONATO O RUTA BIOSINTETICA DE ISOPRENOIDES.**

La vía del mevalonato es una ruta multienzimática, que se lleva a cabo en las fracciones microsomal y soluble del citoplasma y fue originalmente descrita en hígado de mamíferos por Bloch, Lynen, Popjak, Cornforth, Porter y otros en las décadas del 50 y 60 (**Bloch, 1954, 1965; Popjak y Cornforth, 1966**).

La síntesis de mevalonato (fig.I.1.) comienza con la generación de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) a partir de acetil-CoA, en un par de reacciones consecutivas que ocurren en el citoplasma. Estas reacciones son catalizadas por la enzima citosólica acetoacetil coenzima A (AA-CoA) tiolasa y por la HMG-CoA sintasa respectivamente (**Ayté y col.,1990**). Estas dos reacciones son seguidas por una reacción catalizada por una proteína integral del retículo endoplasmático (RE) la HMG-CoA reductasa. En este proceso la HMG-CoA es reducida a mevalonato utilizando NADPH (**Liscum y col., 1983; Brown y Simoni, 1984**). La generación de mevalonato es el primer paso involucrado directamente en la biosíntesis de isoprenoides y el principal punto de regulación de la vía.

A partir de mevalonato se genera la molécula de 5 carbonos isopentenil pirofosfato (IPP), que constituye la unidad estructural cuya polimerización dará origen a los distintos poliisoprenoides productos de la vía. En este punto se produce la primera ramificación de la ruta, dado que el IPP es utilizado tanto para la generación de isopentenil ARNt e isopentenil adenina como para la síntesis de la molécula de 15 carbonos farnesil pirofosfato (FPP) (**Bloch, 1965**).

El FPP constituye el mayor punto de ramificación en la biosíntesis de poliisoprenoides (**Gough y Hemming, 1970; Beytia y Porter, 1976**). Este compuesto es el sustrato de distintas reacciones enzimáticas que conducen a diferentes productos finales:

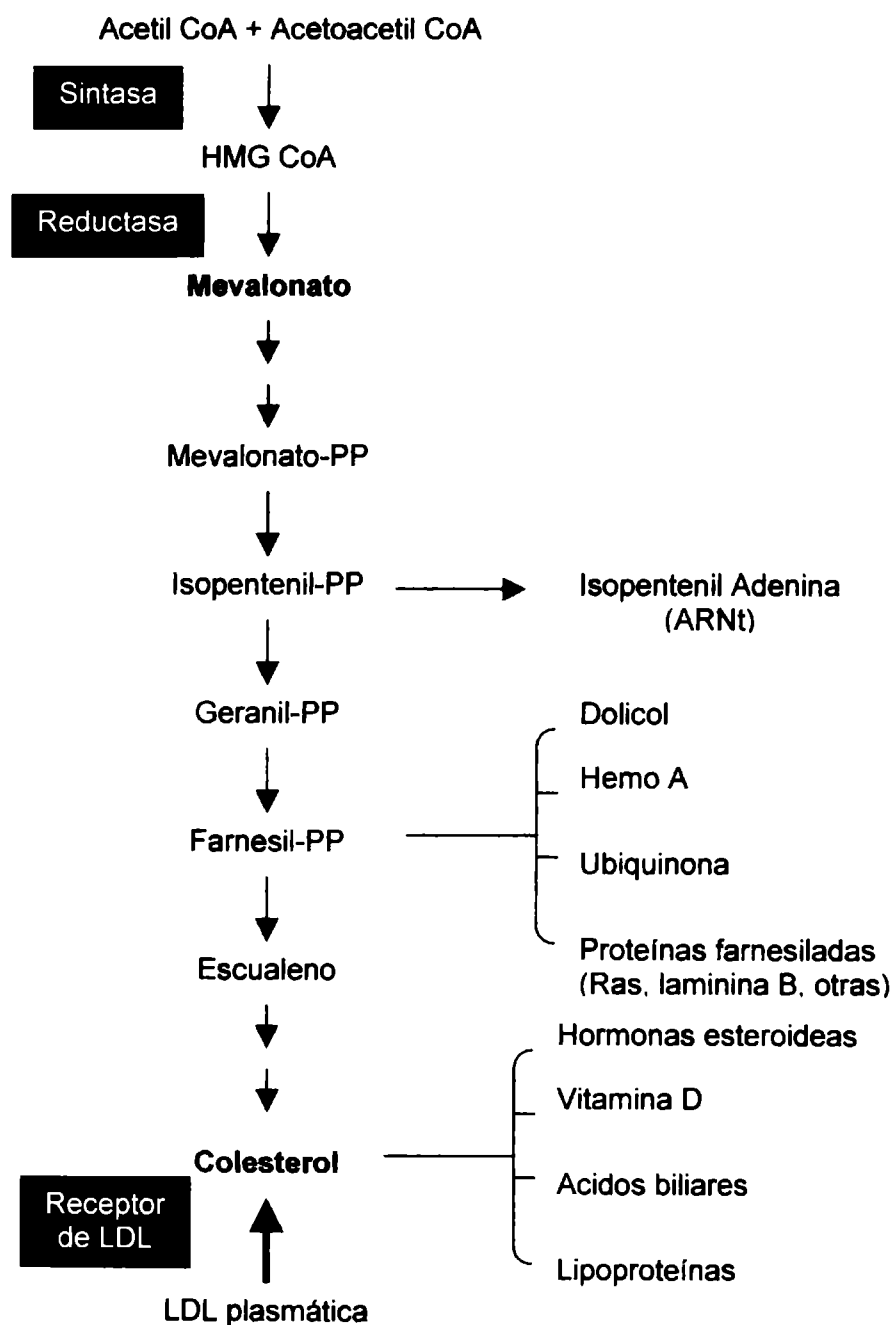
1- Dos moléculas de FPP pueden unirse en una reacción de condensación llamada "cabeza con cabeza" para formar escualeno, un compuesto de 30 carbonos, que es el primer intermediario comprometido directamente con la síntesis de esteroides (**Popjak y col., 1961**).

2- El FPP puede unirse con grupos IPP o con cadenas cortas de poliprenoles por repetidas condensaciones "cabeza con cola" para formar largas cadenas

de poliprenoles con todas sus dobles ligaduras en configuración trans. En humanos, cuando estas cadenas alcanzan las 10 unidades de isopreno, el grupo poliprenilo es transferido a un anillo aromático derivado de la tirosina, para iniciar la síntesis de ubiquinona (**Olson, 1968**).

3- El FPP puede ser convertido en el alcohol poliisoprenoide de cadena larga, dolicol, a través de una serie de adiciones de 16 residuos de isopentenilo . En esta serie de condensaciones se producen dobles enlaces *cis* en la cadena de poliisopreno, algo característico del dolicol (**Gough y Hemming, 1970**).

4- Finalmente el FPP o su derivado el geranylgeranyl-pirofosfato pueden modificar a distintas proteínas con múltiples funciones dentro de las células, uniéndose covalentemente a las mismas incrementando su hidrofobicidad, lo cual les permite insertarse a las membranas celulares. Entre éstas se encuentran la laminina B, la subunidad  $\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas, las proteínas p21<sup>ras</sup> y algunas proteínas "ras-simil" como las G25K y las rac-1 (**Sepp-Lorenzino y col., 1991; Sinensky, 2000**).



**FIGURA 1.1. Vía del mevalonato en células animales.** El principal producto final del metabolismo del mevalonato, el colesterol, se obtiene de dos fuentes: (1) endógena, a partir de acetil CoA ; y (2) exógena, por captación de las LDL del plasma mediada por receptores. El mevalonato también es incorporado en isoprenoides no esteroideos, como se muestra a la derecha de la figura.

### I.B.1.REGULACION DE LA VIA. PUNTOS DE CONTROL

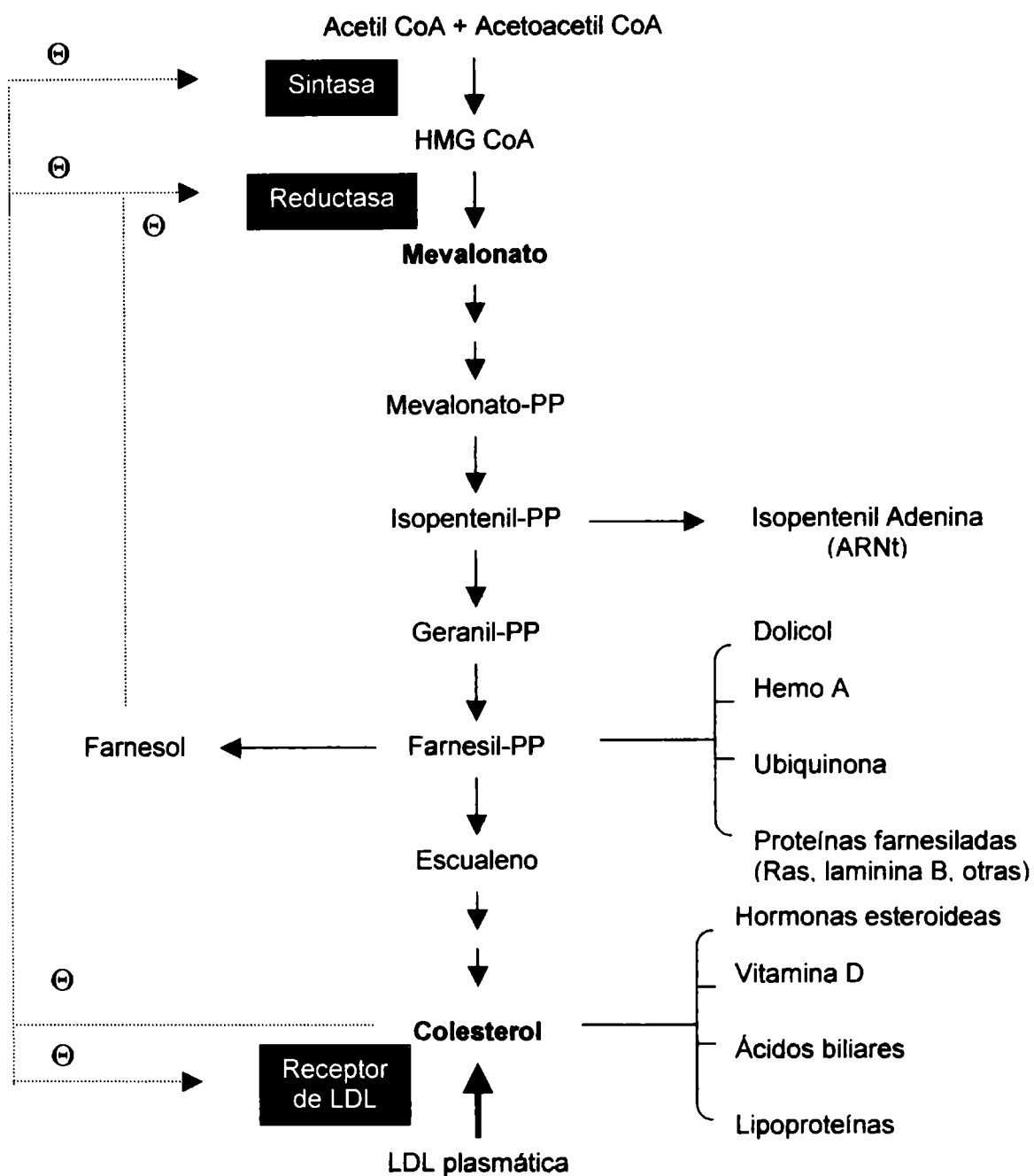
Al ser el mevalonato una molécula precursora de numerosos metabolitos esteroides y no esteroides que ejercen funciones muy diversas dentro de las células eucariotas, su producción y disponibilidad están estrechamente reguladas, de manera tal de asegurar una provisión suficiente de isoprenoides no esteroides y evitar una sobreacumulación de productos potencialmente tóxicos (*Goldstein y Brown, 1990*). Esta regulación se lleva a cabo mediante complejos mecanismos de control ejercidos sobre distintas enzimas de la vía y sobre los receptores de las LDL plasmáticas (fig. 1.2.).

El principal punto de control se encuentra a nivel de la HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la velocidad de la vía. Los mecanismos de control de la reductasa se pueden clasificar en:

- Mecanismos a largo plazo, que operan a nivel de síntesis y degradación de la enzima ocasionando cambios en su concentración.
- Mecanismos a corto plazo, que involucran procesos de fosforilación y desfosforilación que modifican su actividad.

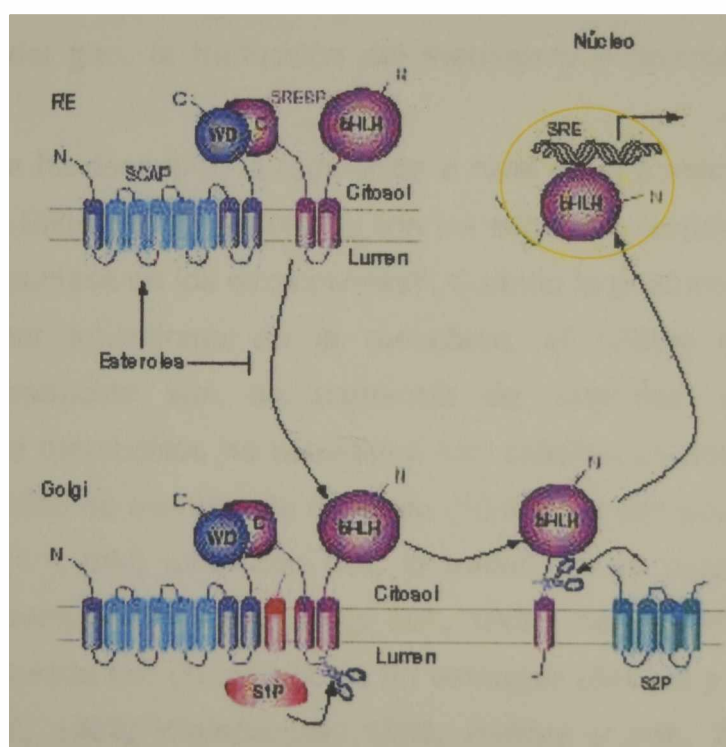
La regulación a largo plazo de la reductasa se realiza a nivel transcripcional y postranscripcional. El control postranscripcional se lleva a cabo tanto sobre la traducción como sobre la degradación enzimática.

Está bien establecido que los esteroides reprimen la transcripción del gen de la reductasa, esta represión es ejercida a través de un corto segmento presente en la región 5' del promotor de dicho gen, denominado elemento regulador de esteroides (SRE-1, por sus siglas en inglés) (*Goldstein y Brown, 1990*). SRE-1 actúa como un regulador condicional positivo, que aumenta la transcripción del gen en células crecidas en ausencia de esteroides, pero que no es necesario para la transcripción basal del mismo. La identificación del SRE-1 condujo al aislamiento y purificación de una familia de factores de transcripción denominados proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs, por sus siglas en inglés). Como su nombre lo indica, las SREBPs se unen al SRE-1 aumentando la transcripción del gen de la reductasa y/o de otros genes involucrados en el metabolismo lipídico, donde este elemento regulador está presente.



**FIGURA I.2. Principales puntos de regulación de la vía del mevalonato.** La homeostasis del mevalonato se logra a través de dos mecanismos: (1) represión por retroalimentación mediada por esteroides de los genes de la HMG CoA sintasa, HMG CoA reductasa y de los receptores de LDL y (2) regulación post-transcripcional de la HMG CoA reductasa, mediada por farnesol, metabolito derivado del farnesil-PP (ambos mecanismos se muestran a la izquierda de la figura).

Las SREBPs son proteínas integrales del RE. Para activar la transcripción de los distintos genes deben migrar al Golgi donde son clivadas por dos proteasas distintas, proteasa de sitio 1 (S1P) y proteasa de sitio 2 (S2P), que liberan a las SREBPs maduras que son las que ingresan al núcleo (**Goldstein y col., 2002**). La migración de las SREBPs al Golgi requiere de una proteína "escolta", proteína activadora del clivaje de SREBPs (SCAP). Esta proteína funciona como un sensor de esteroides, regulando la migración de las SREBPs y la actividad de la S1P, cuando las concentraciones de esteroides son altas SCAP no interacciona con SREBP y no se produce la migración al Golgi (**Edwards y Ericsson, 1999**). Esta situación se ilustra en la figura 1.3.



**FIGURA 1.3. Regulación del procesamiento de SREBP mediada por esteroides.**

La proteína SCAP "escolta" a SREBP desde el retículo endoplasmático (RE) hasta el Golgi en respuesta a bajos niveles de esteroides. SCAP posee un dominio sensor a esteroides (hélices 2-6 en celeste) y forma un complejo con SREBP. Este complejo migra al Golgi donde SREBP es clivada por distintas proteasas como se indica en el texto.

El dominio bHLH (hélice-giro-hélice básico o basic helix-loop-helix) es el que interacciona con el SRE presente en los genes blanco. **Horton y col., 2002.**

La expresión de la HMG-CoA reductasa también es regulada por cambios en la estabilidad y velocidad de traducción de su ARNm así como en la velocidad de degradación de la enzima. Los primeros indicios de como se lleva a cabo este control se obtuvieron por estudios realizados en células cultivadas en presencia de potentes inhibidores de la reductasa. Estos, llamados genéricamente estatines (entre los cuales se encuentran la compactina y el lovastatin), son metabolitos fúngicos (ver Inhibidores de la HMG-CoA reductasa) que inhiben competitivamente a la enzima a concentraciones menores a  $10^{-6}$ M, bloqueando completamente la síntesis de mevalonato (**Endo, 1988**). Estos tratamientos provocan un elevado incremento del ARNm (5-10 veces) de la reductasa, así como en la cantidad de enzima celular (200 veces) (**Goldstein y Brown, 1990**). Estos incrementos pueden explicarse si se asume que al menos un metabolito derivado del mevalonato inhibe la transcripción del gen, la traducción del mensajero y favorece la degradación enzimática.

Como ya se ha descrito, la regulación a nivel de la transcripción es ejercida por esteroides vía SREBPs. Ahora bien, ¿son los esteroides responsables de regular la cantidad de reductasa en los otros niveles?. Cuando la producción de mevalonato es bloqueada por inhibidores de la reductasa, el ARNm de la enzima es eficientemente traducido aún en presencia de esteroides, pero cuando los requerimientos de metabolitos no esteroides son satisfechos por la administración de una gran cantidad de mevalonato exógeno (10 mM), o con pequeñas cantidades de mevalonato (< 1 mM) junto con LDL la traducción se reduce unas 5 veces (**Brown y Goldstein, 1980; Nakanishi y col., 1988**). Actualmente se sabe que la traducción es regulada por un metabolito no esteroide (**Brown y Goldstein, 1980; Nakanishi y col., 1988; Weinberger, 1996; Peffley y col., 2003**), aunque los mecanismos moleculares de esta regulación aún no están esclarecidos.

Con respecto a la estabilidad enzimática, cuando se adiciona colesterol a células desarrolladas inicialmente en presencia de compactina y en ausencia de colesterol exógeno, la velocidad de degradación de la reductasa se incrementa 3 veces. En esta degradación está aparentemente involucrado alguno de los dominios transmembrana de la reductasa, el cual sería sensible a esteroides, como lo prueba el hecho de que la delección de dos o más secuencias del espacio transmembrana



anula el recambio mediado por ellos (**Jingami y col., 1987**). Sorprendentemente, cuando las concentraciones de compactina son tan altas (0,1 mM) que bloquean totalmente la producción de mevalonato, los esteroides no alcanzan a producir la aceleración en la degradación de la reductasa. Esta aceleración sólo se logra cuando se agrega conjuntamente mevalonato, presumiblemente para su incorporación en productos no esteroides. Esto indica que la degradación aumentada de la HMG-CoA reductasa necesita la presencia de un isoprenoide no esteroide así como de esteroides (**Goldstein y Brown, 1990**). El hecho de que el farnesol específicamente aumente la degradación de la enzima *in vitro* (**Correl y Edwards, 1994**) e *in vivo* (**Meigs y col., 1996**) conduce a proponer que éste es el metabolito no esteroide involucrado en la regulación de la degradación de la reductasa (**Sever y col., 2003**).

Por todo lo expuesto se puede asegurar que la reductasa está sujeta a un fino control multivalente de tipo feedback, ejercido por metabolitos esteroideos y no esteroideos derivados del mevalonato.

Además de estos controles a largo plazo, la enzima puede ser inactivada a corto plazo por fosforilación reversible, en una reacción catalizada por una proteína quinasa poco común que es dependiente de AMP (**Gillispie y col., 1992; Corton, 1994**).

Existen otros puntos de control en la vía, principalmente a nivel de la HMG-CoA sintasa y de los receptores de LDL, los genes de estas proteínas también presentan SRE-1 y su transcripción es reprimida por esteroides de una manera similar a la de la reductasa (**Goldstein y Brown, 1990**).

Las células no sólo regulan la síntesis de mevalonato sino también la disposición del mismo. Las enzimas involucradas en las ramificaciones que conducen a la generación de productos no esteroideos presentan afinidades mayores por los sustratos derivados del mevalonato que aquellas involucradas en la vía de síntesis de esteroides. De esta manera cuando la concentración de mevalonato es limitante, éste es derivado en forma preferencial hacia las rutas no esteroideas. Cuando las células son incubadas con esteroides por un tiempo prolongado, la escualeno sintasa (primera enzima directamente comprometida con la síntesis de

esteroles) es inhibida, limitando aún más la incorporación de mevalonato en colesterol u otros esteroides (***Goldstein y Brown, 1990***).

## **I.C.METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS EN MAMIFEROS. DESATURASAS.**

Los ácidos grasos son los componentes principales de los fosfolípidos y esfingolípidos. Estos fosfolípidos junto con el colesterol, constituyen los bloques estructurales de las membranas celulares de mamíferos regulando las propiedades físicas de las mismas. Por este motivo resulta crucial controlar las proporciones relativas de estos lípidos en las membranas biológicas de manera de no alterar el crecimiento o las funciones celulares.

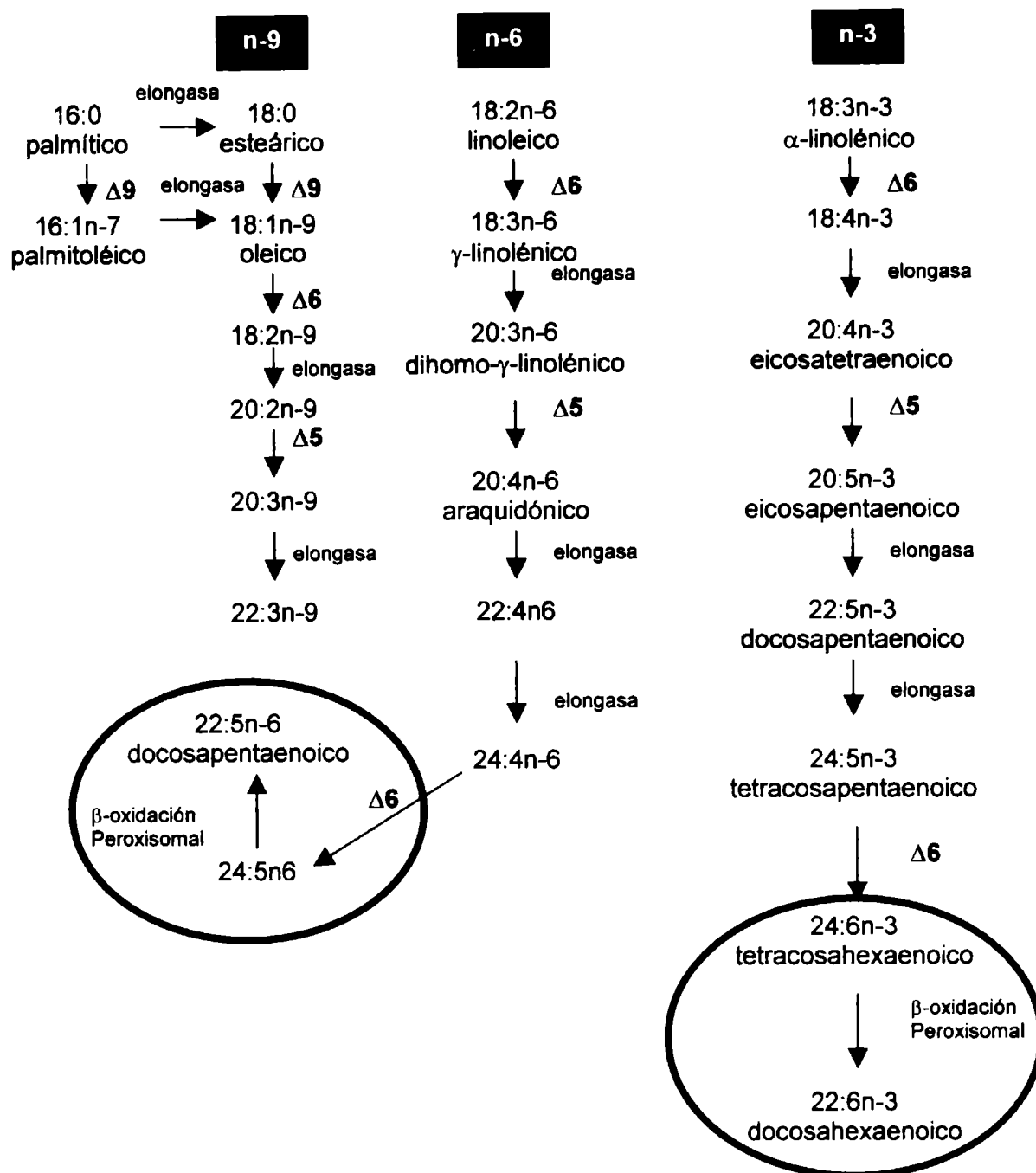
Dentro de los ácidos grasos componentes de los fosfolípidos de membrana, los que revierten mayor importancia son los ácidos grasos insaturados, cuya síntesis y regulación describiremos a continuación.

Las enzimas que catalizan la adición de una doble ligadura (insaturación) en una cadena de ácido graso son denominadas desaturasas de ácidos grasos. Esta familia de enzimas se encuentra ampliamente distribuida en casi todos los seres vivos, donde contribuyen a regular la fluidez de las membranas celulares a través del grado de insaturación de sus ácidos grasos componentes y tienen un rol crítico en la biosíntesis de ácidos grasos polinosaturados (PUFAs, polyunsaturated fatty acids) (**Brenner, 1987, 2003**). Estos PUFAs actúan como precursores de numerosas moléculas con actividad biológica como eicosanoides, feromonas, reguladores de crecimiento y hormonas. En mamíferos, los eicosanoides como las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, actúan localmente a través de procesos autócrinos o parácrinos sobre receptores de superficie ligados a proteínas G. Esto conduce a la activación de varios mecanismos de señalización que tienen efectos en numerosas funciones celulares incluyendo quimiotaxis, permeabilidad vascular, inflamación, vasoconstricción, etc (**Jump, 2002**). Por este motivo la regulación de la biosíntesis de los PUFAs es un blanco importante en el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas como artritis, diabetes, inflamación, cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras.

La reacción de desaturación, catalizada por las desaturasas, es un proceso aeróbico que utiliza oxígeno molecular y equivalentes de reducción obtenidos de una cadena de transporte de electrones. Existen tres tipos de desaturasas, las únicas presentes en animales son las acil-CoA desaturasas, enzimas microsomales

unidas a membrana cuyo sustrato son ácidos grasos esterificados con coenzima A (CoA). En el proceso de síntesis de los PUFAs, las diferentes desaturasas, junto con una familia de enzimas llamadas elongasas, introducen una serie de desaturaciones y elongaciones consecutivas en la cadena de ácido graso para generar ácidos grasos polinosaturados de cadena más larga como el ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) (fig I.4.). Las desaturasas reciben su nombre de acuerdo a la posición en la cual se ubica la insaturación en la cadena de acil-CoA, encontrándose en animales actividad  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasa, el doble enlace se introduce entre los carbonos #9 y #10, #6 y #7 y #5 y #6 respectivamente (**Brenner, 1987, 2003; Jump, 2002**).

Las células animales son capaces de desaturar el ácido esteárico (SA, 18:0) a ácido oleico (OA 18:1 n-9) por acción de la estearil-CoA desaturasa (SCD) o  $\Delta 9$  desaturasa, sin embargo carecen de las enzimas necesarias para producir los ácidos linoleico (LA, 18:2 n-6) y  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3 n-3), razón por la cual estos ácidos son considerados esenciales y deben ser incorporados a través de la dieta. Como puede observarse en la figura I.4., estos ácidos grasos esenciales pueden ser sucesivamente desaturados y elongados dependiendo de la especie animal y de las actividades de las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas en los distintos tejidos (**Pereira y col., 2003**).



**FIGURA I.4. Biosíntesis de ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) en animales. Se indican las tres familias de ácidos grasos principales (n-9/n-6 y n-3)**

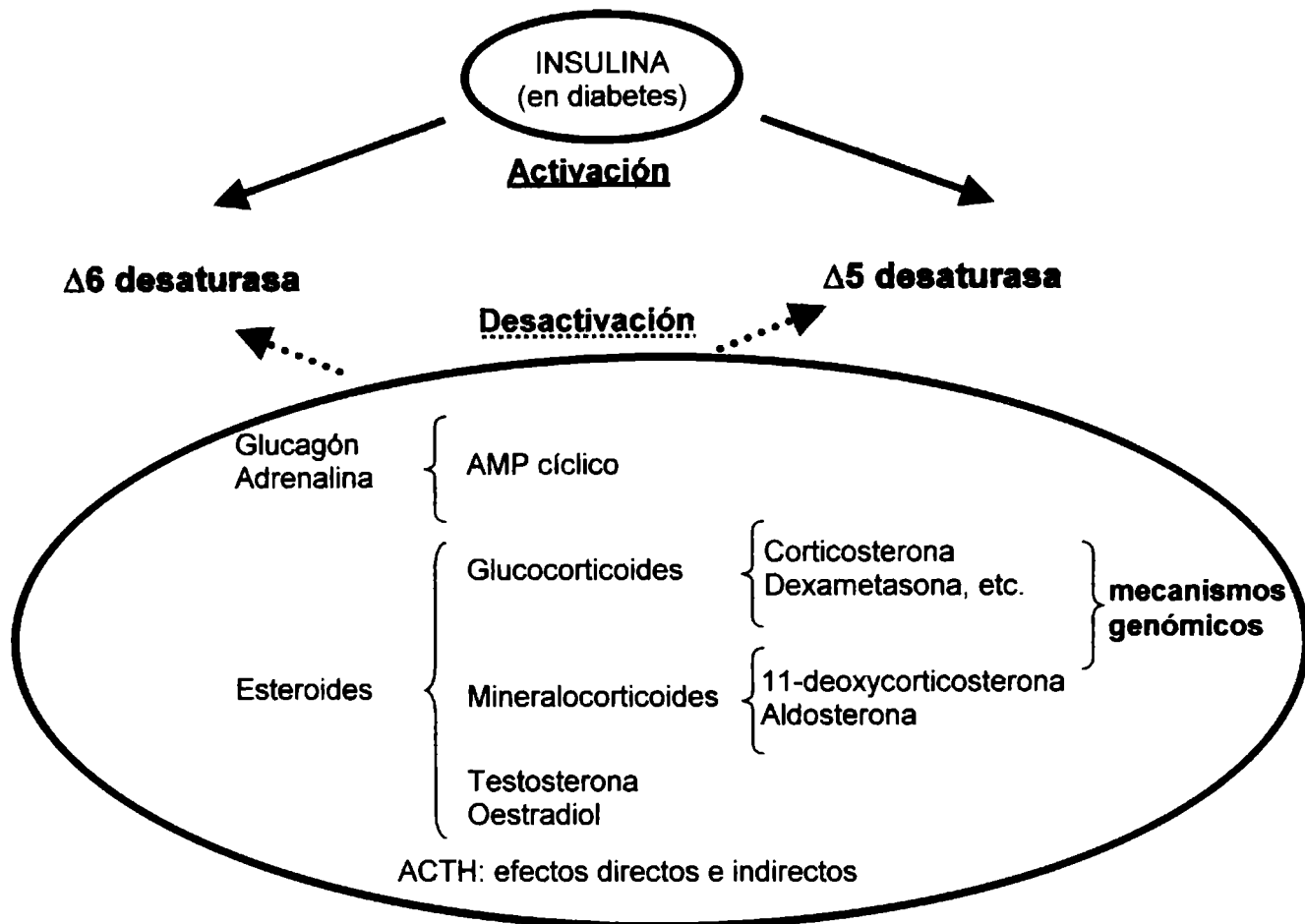
### I.C.1.REGULACION DE LAS DESATURASAS

La SCD ( $\Delta 9$  desaturasa) es una de las desaturasas más estudiadas hasta la fecha, es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y juega un papel esencial en el mantenimiento de la fluidez de las

membranas celulares. Numerosos factores dietarios, de desarrollo, hormonales y ambientales regulan la expresión de la SCD. Las dietas ricas en carbohidratos y libres de grasas inducen la expresión hepática del ARNm de la  $\Delta 9$  desaturasa en ratones (*Ntambi y col. 1988; Ntambi, 1992; Waters y Ntambi, 1994*). La insulina (*Waters y Ntambi, 1994; Ntambi y col., 1996*), la glucosa y la fructosa (*Waters y Ntambi, 1994; Jones y col., 1998*), el colesterol (*Landau y col., 1997; Repa y col., 2000*), las bajas temperaturas (*González y col., 1983; Tiku y col., 1996*), la luz (*Kis y col., 1988*) y algunas drogas (fibratos y proliferadores peroxisomales) (*Miller y Ntambi, 1996*) inducen la expresión del gen de la  $\Delta 9$  desaturasa en distintos organismos. Por otro lado, los ácidos grasos polinosaturados especialmente los de las familias n-6 y n-3 (*Ntambi, 1992*), el etanol (*Nervi y col., 1980; Rao y col., 1984*), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (*Weiner y col., 1991*), la interleukina-11 (IL-11) (*Boney y col., 1996*), las hormonas tiroideas (*Waters y col., 1997*), el AMPc (o drogas que aumenten sus niveles intracelulares) (*Storlazzi y col., 1999*) inhiben la transcripción del ARNm y la actividad de la  $\Delta 9$  desaturasa en hígado. Los glucocorticoides, mineralocorticoides y algunos esteroides sexuales aumentan la actividad de la enzima en distintos órganos (*T.de Alaniz y Marra, 2003*). La insulina y las dietas ricas en carbohidratos inducen la expresión del gen de la SCD a través de un mecanismo dependiente de la SREBP-1 que se une al SRE presente en el promotor del gen de la  $\Delta 9$  (*Kersten, 2001*). Los PUFAs reprimen la expresión de la SCD reduciendo la expresión y maduración de la SREBP-1 (*Ntambi, 1999*). El colesterol induce a la enzima por dos mecanismos, uno dependiente de la SREBP-1c y otro del receptor hepático X de tipo alfa (LXR $\alpha$ ) (*Repa y col., 2002*). Los proliferadores peroxisomales ejercen su función a través de los receptores activados por proliferadores peroxisomales de tipo alfa (PPAR $\alpha$ ) (*Miller y Ntambi, 1996*), mientras que las hormonas tiroideas lo hacen a través de receptores específicos para las mismas (*Waters y col., 1997*). Los mecanismos por los cuales el AMPc, el alcohol, la temperatura, la IL-11y el TNF $\alpha$  regulan a la SCD aún no han sido dilucidados. Aparte de estos mecanismos fisiológicos o farmacológicos que controlan la actividad de la SCD, varias enfermedades como cáncer (*Li y col., 1994*) obesidad (*Jones y col., 1996*), aterosclerosis y diabetes (*Mercuri y De Tomas,*

**1977; Worcester y col., 1979; Rahman y col., 2003; Miyazaky y Ntambi, 2003)** están asociadas con una expresión alterada de la enzima.

Otros puntos importantes en la regulación de la síntesis de los ácidos grasos en mamíferos se encuentran a nivel de las  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, la actividad de estas enzimas está regulada por la dieta, la edad y distintas hormonas, además de que su expresión también se encuentra alterada en algunas enfermedades como cáncer (**Nakamura y col., 2000**) diabetes (**Rimoldi y col., 2001**) y Alzheimer (**Nakada y col., 1990**). En general ambas enzimas responden de manera similar a la estimulación hormonal, como puede apreciarse en la figura 1.5., sólomente la insulina aumenta su actividad mientras que otras hormonas la disminuyen. Los pasos seguidos por las diferentes hormonas para ejercer sus efectos finales sobre las desaturasas no son conocidos en su totalidad. En algunos casos, como el efecto de la insulina sobre la  $\Delta 6$  desaturasa, la regulación aparentemente se lleva a cabo controlando la transcripción del ARNm vía SREBP-1c. Otras hormonas, como la adrenalina o la ACTH parecen necesitar la estimulación previa de la formación de AMPc para ejercer su control. En el caso de los glucocorticoides la regulación se logra a través de distintos efectos genómicos (**Brenner, 2003; T.de Alaniz y Marra, 2003**).



**FIGURA III.5. Regulación hormonal de la biosíntesis de ácidos grasos polinsaturados a través de la modulación de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasa en mamíferos. Brenner, 2003.**



## **I.D. INTEGRACION DEL METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS Y ESTEROLES EN CELULAS DE MAMIFEROS.**

Los esteroides y los ácidos grasos se sintetizan en rutas metabólicas distintas, pero ambas vías están reguladas por una familia de factores de transcripción, las ya mencionados SREBPs. Se sabe que existen tres tipos de SREBPs en las células animales, las SREBP-1a y -1c derivan de diferentes sitios de inicio de la transcripción en el promotor del gen de SREBP-1, SREBP-2 es transcrito a partir de un gen diferente. Las células de distintos tejidos en cultivo así como los distintos órganos animales producen los tres tipos de SREBPs pero en distintas proporciones (*Osborne, 2002*).

Todas las SREBPs activan la transcripción de una misma familia de genes blanco, estos genes pueden ser divididos en genes relacionados con el metabolismo del colesterol y genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos (*Brown y Goldstein, 1997*).

En la ruta biosintética del colesterol, las SREBPs activan directamente la transcripción de los genes que codifican la HMG-CoA sintasa, la HMG-CoA reductasa, la farnesil difosfato sintasa y la escualeno sintasa. En la vía de síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, los genes blanco son los de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), glicerol-3-fosfato aciltransferasa y la SCD, así como también la ATP citrato liasa, enzima del complejo elongante del 16:0 y 18:0. Las SREBPs también activan la transcripción del gen de los receptores de LDL, que incorporan colesterol y ácidos grasos del plasma esterificados con colesterol (*Horton y col., 2002*).

Está bien establecido que la activación de la colesterogénesis por las SREBPs está mediada exclusivamente por la unión de éstos a los SREs presentes en los promotores de los genes blanco. Los elementos de unión, dentro de los promotores de los genes de las enzimas de síntesis de ácidos grasos, aún no han sido bien identificados.

Con el objetivo de estudiar el rol individual de los SREBP, se realizaron numerosos experimentos *in vitro* de los cuales se concluyó que existen diferencias sustanciales en la capacidad de SREBP-1a, -1c y 2 para estimular la expresión de

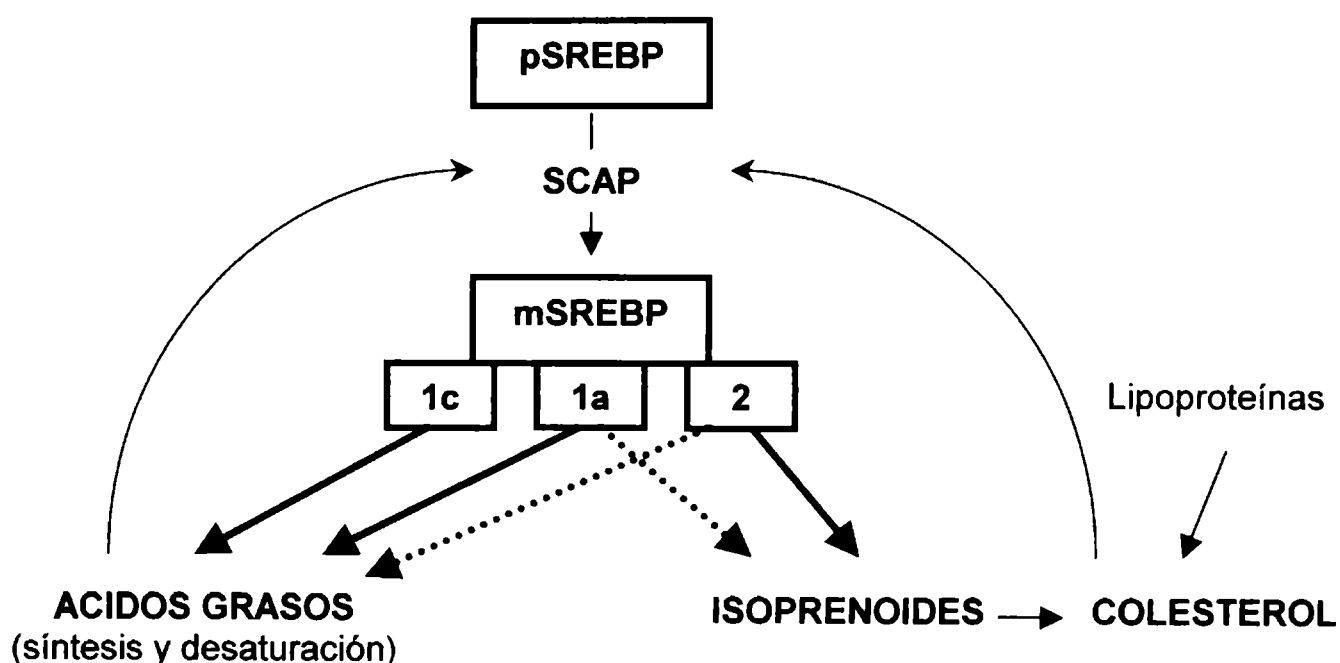
los genes involucrados en la síntesis de colesterol con respecto a los genes lipogénicos (*Guan y col., 1998; Pai y col., 1998*). SREBP-2 aumentaría fundamentalmente la transcripción de los genes relacionados con la colesterogénesis, mientras que SREBP-1c induciría la expresión de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos y SREBP-1a tendría influencia sobre ambas vías. (*Kim y Speigelman, 1996; Shimano y col., 1997; Horton y col., 2002*).

Es claro entonces que las SREBPs regulan la producción de ácidos grasos y colesterol. También se conoce la regulación del colesterol sobre el procesamiento de estas proteínas (ver Regulación de la Vía del mevalonato. Puntos de control), los interrogantes que surgen son cómo regulan los ácidos grasos el procesamiento de los SREBPs y cuál es la influencia de aquellos sobre la síntesis de colesterol y viceversa. Algunos estudios demostraron que los ácidos grasos insaturados potencian los efectos supresores de los esteroides en células en cultivo (*Thewke y col., 1998; Worgell y col., 1998*). Mientras que los esteroides aparentemente fueron más efectivos que los ácidos grasos en suprimir la maduración de las SREBPs y la expresión de los genes blanco, la adición de ácidos grasos exógenos en presencia de esteroides contribuyó a una supresión adicional. Es posible entonces, que los ácidos grasos o algún derivado de los mismos afecte directamente el procesamiento de las SREBPs. Por si solos, los ácidos grasos insaturados, demostraron ser capaces de suprimir el procesamiento de las SREBPs y la expresión de los genes regulados por SRE en tres líneas celulares a concentraciones del orden de 200  $\mu$ M (*Worgell y col., 1998*). Alternativamente, la incorporación de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos podría alterar el medio ambiente de las membranas e incrementar la sensibilidad del complejo SREBP-SCAP a los esteroides.

Dado que la supresión del procesamiento de las SREBPs está regulada tanto por los esteroides como por los ácidos grasos de manera aditiva, se crea una situación en la cual las necesidades celulares de estos lípidos se encuentran aseguradas a pesar de que la síntesis *de novo* en alguna de las vías esté inhibida. La disminución del contenido de esteroides o de ácidos grasos causada por una inhibición de su síntesis llevaría a un aumento del procesamiento de las SREBPs con el consecuente aumento de la transcripción de los genes blanco de manera tal

de compensar esta disminución y asegurar así una provisión de lípidos adecuada para la célula (*Ridgway y col., 1999*).

En resumen los SREBPs incrementan la síntesis de ácidos grasos y colesterol y dado que estos lípidos pueden modular las propiedades funcionales de las membranas celulares los SREBPs parecen ser los organizadores centrales de la composición y función de las mismas.



**FIGURA I.5. Regulación del metabolismo de ácidos grasos y colesterol mediada por las distintas isoformas de los SREBPs**

La síntesis de colesterol y ácidos grasos está controlada por una regulación de tipo feedback del procesamiento proteolítico de los SREBPs, mediada por SCAP. Las flechas llenas y punteadas que salen de las distintas isoformas de SREBP indican la mayor (llenas) o menor (punteadas) influencia de cada isoforma sobre las distintas vías metabólicas. pSREBP (precursor de SREBP); mSREBP (SREBP maduro).

## **E.SINTESIS DE COLESTEROL Y DE ISOPRENOIDES NO ESTEROIDES. RELACION CON LA REPLICACION DEL ADN Y EL CICLO CELULAR.**

Desde la década del '40 hasta la actualidad se han presentado numerosas evidencias de que el colesterol, e indudablemente otros isoprenoides, desempeñan un papel crítico en el crecimiento y división de células eucariotas.

### **SINTESIS DE COLESTEROL Y CRECIMIENTO CELULAR.**

La primera evidencia de la relación entre la colesterogénesis y el crecimiento celular fue provista por Srere, Chaikoff y Dauben (**Srere y col., 1948**) quienes observaron que los tejidos de crecimiento rápido como los cerebros de ratas recién nacidas presentaban una activa síntesis de colesterol a partir de fragmentos de dos carbonos, mientras que los cerebros de ratas adultas, con muy poco recambio celular, llevaban a cabo una colesterogénesis a muy baja velocidad. Esta observación anticipó estudios posteriores que demostraron que existe una excelente correlación entre las velocidades de replicación celular y la velocidad de síntesis de colesterol.

Los tejidos de proliferación rápida, entonces, presentan niveles elevados de síntesis de colesterol así como de HMG-CoA reductasa, todo lo contrario sucede en tejidos con bajo recambio celular, como el riñón. La única excepción a esta generalización es el hígado adulto que, a pesar de presentar poco recambio, sintetiza colesterol activamente. Esto se debe a que, dado que el hígado es la mayor fuente de colesterol sérico, la síntesis de colesterol "de novo" es requerida para su función de órgano exportador más que para suplir las necesidades de proliferación celular. Esta correlación entre proliferación celular y actividad de la vía biosintética del colesterol es consistente con la rápida regeneración hepática que sigue a una hepatectomía parcial, caracterizada por una por una elevada velocidad de síntesis de colesterol (**Siperstein y Fagan, 1964**).

La correlación entre la proliferación celular, la síntesis de colesterol y la actividad reductasa ha sido demostrada en varios sistemas de cultivo de tejidos. Chen, Heninger y Kandutsch (**Chen y col., 1975**) fueron los primeros en reportar

que linfocitos de ratón estimulados con hemaglutinina sufren un aumento de seis veces en la incorporación de acetato en colesterol 24 horas antes de que las células entren en la fase S del ciclo celular. Huneus, Wiley y Siperstein (**Huneus y col., 1979**) demostraron que, luego de la liberación desde un doble bloqueo con timidina de células de riñón de hámster bebé (BHK-21), hay un incremento en la actividad de la HMG-CoA reductasa que precede a la primera duplicación celular. Habenicht, Glomset y Ross (**Habenicht y col., 1980**) demostraron un incremento similar en la reductasa y en la síntesis de colesterol tanto en fibroblastos de ratón como en células de músculo liso seguido a la estimulación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Aparentemente, las células en rápida proliferación también pueden satisfacer sus necesidades de colesterol incrementando la incorporación de colesterol exógeno. Goldstein y Brown (**Goldstein y Brown, 1974**) y Witte y col. (**Witte y col., 1982**) demostraron un incremento en los receptores de LDL en células en proliferación, sugiriendo que estas células pueden satisfacer al menos algunos de sus requerimientos de colesterol por un incremento en la captación de LDL ricas en colesterol.

## **REQUERIMIENTOS DE COLESTEROL EN EL CRECIMIENTO Y PROLIFERACION CELULAR.**

Los estudios citados anteriormente establecen una correlación entre la síntesis de colesterol, el crecimiento y la proliferación celular, pero no logran responder directamente al interrogante de por qué es requerido el colesterol en la replicación celular.

Dado que el colesterol es un componente de las membranas celulares, no es sorprendente que un suministro del mismo sea necesario para la proliferación de membranas que acompaña al crecimiento celular, requerimiento que puede ser satisfecho, como ya se mencionó, por incorporación exógena. Cuando no hay colesterol exógeno disponible se incrementa la síntesis de mevalonato de manera tal de mantener la provisión de colesterol y otros isoprenoides. De modo que, para establecer una verdadera necesidad de colesterol en el crecimiento celular, fue

necesario inhibir específicamente la síntesis de mevalonato en ausencia de un suministro de colesterol exógeno.

El primer dato de que tal inhibición de la síntesis de colesterol puede inhibir el crecimiento celular fue aportado por Chen, Kandutsch y Waymouth (**Chen y col., 1974**), quienes probaron que el tratamiento de células T de ratón con 25-hidroxi o 20-hidroxicolesterol, compuestos que inhiben la HMG-CoA reductasa, podía bloquear el crecimiento y la proliferación de estas células. Posteriormente, los estudios de Goldstein, Helgeson y Brown (**Goldstein y col., 1979**) y de Kaneko, Hazama-Shimada y Endo (**Kaneko y col., 1978**) mostraron que el tratamiento durante 6 a 9 días con compactina, un muy potente inhibidor competitivo de la reductasa (ver Inhibidores de la vía del mevalonato), también previene la proliferación celular en cultivos de tejidos.

Brown y Goldstein (**Brown y Goldstein, 1974**), Kandutsch y Chen (**Kandutsch y Chen, 1977**) y Cornell y col. (**Cornell y col., 1977**) demostraron que el agregado de mevalonato o colesterol puede revertir la inhibición de la proliferación celular causada por oxisteroles. Por otra parte, Kaneko y col. (**Kaneko y col., 1978**) hicieron la importante observación de que, aún en presencia de colesterol, la adición de mevalonato es necesaria para restablecer la proliferación de células inhibidas con compactina, una observación que posteriormente fue confirmada por Brown y Goldstein (**Brown y Goldstein, 1980**). Estos dos últimos estudios indican que, además del colesterol, para el crecimiento celular serían necesarios otros productos derivados del mevalonato.

## **PAPEL DE LOS ISOPRENOIDES EN LA SINTESIS DE ADN.**

Quesney-Huneus y col. fueron los primeros en demostrar que el mevalonato, independientemente de servir como precursor para cubrir las necesidades de colesterol estructural para el crecimiento celular, podría regular la proliferación celular ejerciendo un papel directo en la replicación del ADN. Distintos experimentos realizados por estos autores demuestran que hay un aumento en la HMG-CoA reductasa previo o simultáneo a la fase S del ciclo celular. De hecho cuando la actividad reductasa es bloqueada con compactina la replicación de ADN se inhibe,

inhibición que puede ser revertida en minutos con el agregado de mevalonato al medio de cultivo pero no con el agregado de colesterol. Estos datos proveen la primera evidencia de que el mevalonato, independientemente de su función como precursor en la síntesis de colesterol tiene un rol crítico en la iniciación de la síntesis del ADN (**Quesney-Huneeus y col., 1979**).

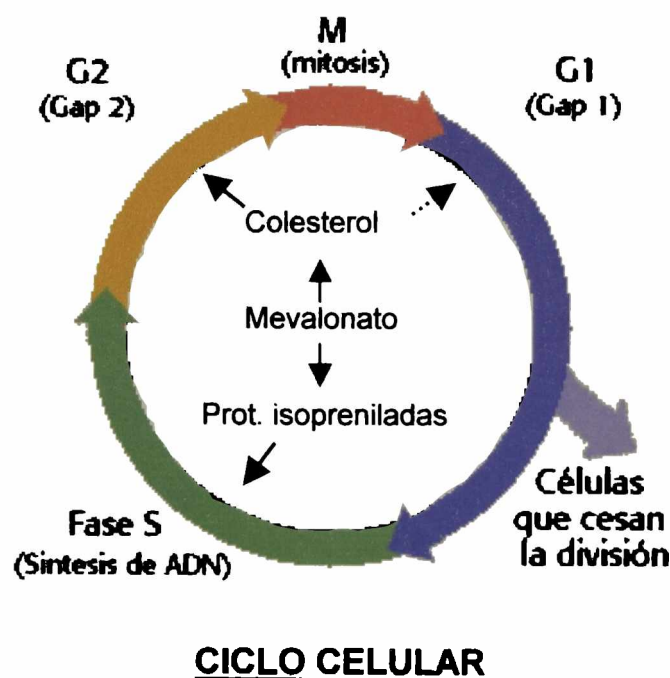
El mecanismo exacto por el cual el mevalonato puede iniciar la síntesis de ADN aún hoy no ha sido esclarecido totalmente, sin embargo los posibles efectores que relacionan la vía de síntesis de colesterol y la de síntesis de ADN parecen ser las distintas proteínas isopreniladas. Entre las más estudiadas están las pertenecientes a la superfamilia de las proteínas G pequeñas, dentro de las cuales podemos identificar a las familias Ras, Rho y Rab. Estas familias de proteínas se caracterizan por anclarse a distintas membranas dentro de la célula (de esta manera ejercen su función) a través de sus residuos farnesilo o geranilgeranilo (**Hancock y col., 1989; Schafer y col., 1989; Joyce y Cox, 2003**). Las distintas familias mencionadas presentan múltiples funciones dentro de la célula, las proteínas Ras regulan la expresión génica activando distintas quinasas que finalmente conducen a la expresión de distintos genes y la síntesis de ADN, las Rho también regularían la expresión génica así como la reorganización del citoesqueleto, y finalmente las Rab regulan el tráfico intracelular mediado por vesículas (**Takai y col., 2001**).

De esta manera los distintos intermediarios en la vía biosintética de colesterol pueden conectar distintos sucesos ocurridos en la superficie celular con procesos nucleares pudiendo inducir la trasducción de señales que llevan a la producción de segundos mensajeros, activación de proteínas quinasas, etc, y finalmente resultarían en la activación de distintos genes y la consiguiente síntesis de ADN (**Rao, 1995**).

Otros estudios, también realizados en cultivos celulares tratados con estatines demostraron que el mevalonato y/o sus derivados no esteroideos son requeridos para la transición entre las etapas G<sub>1</sub>-S del ciclo celular, mientras que el colesterol es específicamente necesario para la fase G<sub>2</sub>. Por este motivo el ciclo celular puede ser perturbado en distintos puntos dependiendo de la disponibilidad relativa de cada uno de estos metabolitos (**Martínez-Botas y col., 2001**). El hecho de que el arresto de las células en G<sub>1</sub> por tratamiento con estatines pueda ser revertido parcialmente por

la provisión de geranylgeraniol, sugiere que alguna proteína isoprenilada aún no identificada estaría desempeñando un papel importante en este proceso apoyando lo mencionado anteriormente (*Vogt y col., 1996; Crick y col., 1998*).

En resumen, existe ahora amplia evidencia de que el crecimiento celular y la replicación del ADN están estrechamente relacionados con la colesterogénesis. El ácido mevalónico cumpliría entonces dos funciones en el ciclo celular (fig.1.7.), primero actúa como precursor del colesterol que es necesario para la síntesis de membranas, y segundo, independientemente de este rol, ha demostrado que sirve como un iniciador y regulador en la síntesis de ADN, aparentemente a través de sus derivados isoprenilados (*Quesney-Huneus y col., 1979; Soma y col., 1992; Singh y col., 2003*).



**FIGURA 1.7. Rol del mevalonato en el ciclo celular y la síntesis de ADN**



## SINTESIS DE MEVALONATO Y CANCER.

Un hecho importante en las transformaciones malignas es la pérdida de la inhibición por retroalimentación ejercida por el colesterol sobre su propia síntesis (**Siperstein y Fagan, 1964; Erickson y col., 1988; Cuthbert and Lipsky, 1991; Buchwald, 1992; Bennis y col., 1993; Hentosh y col., 2001; Singh y col., 2003**). Sumado a este hecho las células cancerosas parecen requerir un incremento en las concentraciones de colesterol y sus precursores excediendo sustancialmente a la síntesis endógena, a pesar de que la velocidad de la misma se encuentra aumentada (**Rao, 1986; Rao y col., 1988**), debiendo usar el colesterol sintetizado por el huésped para crecer y sobrevivir.

Una de las posibilidades que explicarían la síntesis de colesterol anormal que presentan las células neoplásicas es suponer que estas células tengan mutaciones en el SRE-1 presente en el promotor de la reductasa, lo que conduciría a una transcripción no reprimida por esteroides.

Esta falta de regulación en la expresión de genes mediada por esteroides podría ser una consecuencia de la activación constitutiva de vías de traducción de señales que median el crecimiento tumoral, la supervivencia y la supresión de apoptosis presente en las células neoplásicas (**Singh y col., 1999; Kotzka y col., 2000**).

Sería razonable asumir, entonces, que se puede alcanzar una inhibición de la proliferación de células tumorales, o incluso prevenir su crecimiento, restringiendo la disponibilidad de mevalonato y/o colesterol o su síntesis. Numerosos estudios realizados *in vivo* o en cultivos celulares han demostrado que disminuyendo la concentración de colesterol plasmática o interviniendo en la vía del mevalonato con inhibidores de la HMG-CoA reductasa se logra disminuir el crecimiento tumoral (**Yu y col., 1995; Burke y col., 1997; Elson y col., 1999; Peffley y col., 2002; Seeger y col., 2003; Chan y col., 2003**), aunque los resultados son contradictorios (**Hawk y col., 1996; Polo y G.de Bravo, 2001**).

Por todo lo expuesto, resulta de sumo interés estudiar el efecto de distintos inhibidores de la vía del mevalonato sobre la proliferación de células tumorales.

## **I.F. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL.**

Estudios clínicos y nutricionales han indicado que los niveles altos de colesterol en sangre podrían ser una de las principales causas de aterosclerosis y patologías cardíacas. El obtener una droga que disminuyese la colesterolemia por bloqueo de la síntesis endógena, significaba un desafío para los distintos grupos de investigación. El principal blanco de una droga de este tipo fue la HMG-CoA reductasa, por ser la enzima limitante de la velocidad en la ruta biosintética del colesterol, de manera tal que inhibiendo a la reductasa podrían controlarse los niveles de colesterol sérico.

### **I.F.1. INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA REDUCTASA.**

#### **ESTATINES.**

El objetivo de obtener una droga que disminuya el colesterol plasmático inhibiendo la HMG-CoA reductasa se logró con el descubrimiento de una serie de metabolitos fungales estrechamente relacionados, los cuales fueron denominados genéricamente "estatinas" o "vastatinas".

El primero de estos compuestos en ser aislado fue el mevastatin (ML-236B) (*Endo y col., 1976*) o compactin (*Brown y col., 1976*) obtenido del *Penicillium citrinum* y *P. brevicompactum*. Luego se aisló el lovastatin, compuesto estrechamente relacionado cuyo nombre formal es monocolin K (*Endo, 1979, 1980*) y mevilonin (*Alberts y col., 1980*). Posteriormente se sumaron el pravastatin (*Tsujita y col., 1986*), producto de la oxidación bacteriana del mevastatin y el simvastatin también conocido como sinvinolin y MK-733, aislado de *A. terreus*. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 1.8., junto con otros dos inhibidores sintéticos de la reductasa estructuralmente relacionados (*Lee, 1987*).

El primer estatin que demostró ser un inhibidor de la HMG-CoA reductasa fue el mevastatin (*Endo y col., 1976*), seguido por el lovastatin (*Alberts y col., 1980*). Todos los estatinas son inhibidores competitivos de la reductasa con los siguientes valores de  $K_i$ : mevastatin 1,4 nM; lovastatin 0,3 nM; pravastatin 2,3 nM; simvastatin 0,12 nM (*Hoeg y Brewer, 1987*).

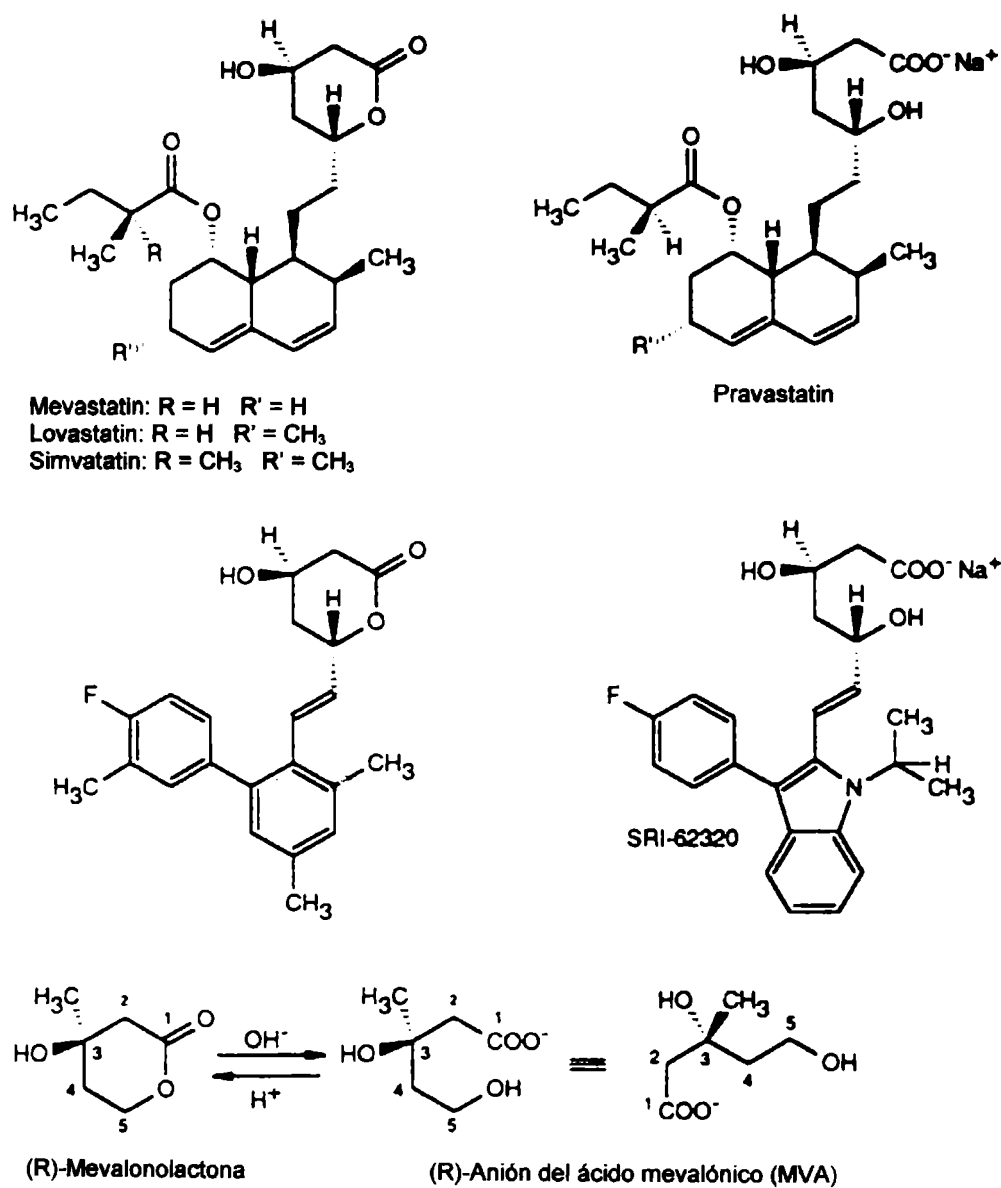
Como puede observarse en la figura 1.8., donde se muestran las estructuras del anión del ácido mevalónico y de la mevalonolactona, todos estos inhibidores tienen en su estructura una porción similar a estos compuestos. En condiciones ácidas el mevalonato pierde una molécula de agua y cierra un anillo para formar la  $\delta$ -lactona o mevalonolactona, en condiciones alcalinas el anillo de la lactona se abre y se forma el anión del ácido mevalónico. Esto también ocurre con los estatines, los cuales al ser administrados oralmente se encuentran como lactonas en el medio ácido del estómago y como anillo abierto en el medio alcalino del intestino delgado. De esta manera son absorbidos, transportados a los distintos tejidos, principalmente al hígado, y ejercen su función inhibiendo activamente a la reductasa.

Estos inhibidores han demostrado ser efectivos en la disminución del colesterol sérico a través de numerosos estudios realizados. El mevastatin demostró tener efecto en perros y en pacientes humanos con hipercolesterolemia (**Yamamoto y col., 1980**). El lovastatin reduce los niveles de colesterol plasmático en sujetos normales (**Tolbert, 1982**) y en individuos con hipercolesterolemia familiar heterocigota (**Havel y col., 1987**) y no familiar (**The Lovastatin Study Group II 1986**). La reducción de colesterol comprende tanto al colesterol total como al LDL-colesterol (**Illingworth y Sexton, 1984; Havel y col., 1987**).

El mecanismo por el cual los estatines disminuyen el colesterol plasmático se relaciona con el aumento de los receptores de LDL hepáticos. Como ya se mencionó el colesterol es incorporado en los distintos tejidos por endocitosis de las LDL circulantes. El principal tejido responsable de esta remoción de las LDLs y, por consiguiente del colesterol que forma parte de las mismas, es el hígado (**Spady y col., 1983**). El proceso de endocitosis de las LDLs es a través de receptores específicos (**Brown y Goldstein, 1986**) presentes en la cara externa de la membrana plasmática de los hepatocitos. De acuerdo a lo que se mencionó anteriormente (ver Regulación de la vía del mevalonato. Puntos de control) cualquier agente que disminuya el contenido de colesterol celular estimulará la transcripción del gen de los receptores de LDL vía SRE1 incrementando así el número de receptores en membrana (**Goldstein y Brown, 1990**). Este incremento de los receptores en la superficie celular puede aumentar la velocidad de captación de las LDL de la sangre y consecuentemente reducir los niveles de colesterol sérico.

Claramente, los estatines, siendo inhibidores competitivos de la reductasa, son unos de estos agentes que disminuye el contenido de colesterol celular bloqueando su síntesis.

Los posibles efectos adversos de estos inhibidores son independientes de su acción sobre las LDL, estos ocurren esporádicamente y tienen significancia clínica especialmente cuando reportan una interacción no deseada con otras drogas. Clínicamente se han observado severas interacciones en pacientes tratados con simvastatin y lovastatin que reciben mibefradil (*Davingnon y col., 1999; Wierzbicki y col., 2003*). Algunos casos de rabdomiólisis (síndrome causado por daño en el músculo esquelético con la resultante liberación del contenido de células musculares al plasma) han sido reportados en terapias combinadas con fibratos (*Davingnon y col., 1999; Wierzbicki y col., 2003*). Además se reportaron 10 casos de reacciones de hipersensibilidad, incluyendo polimialgias, urticaria y angioedema inducidos por estatines (*Davingnon y col., 1999*). Sin embargo, las importantes ventajas aportadas por estas drogas en el tratamiento de la hipercolesterolemia y en la reducción del riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular, sumado al hecho que los efectos colaterales reportados son pocos o están asociados a interacciones con otras drogas (*Wierzbicki y col., 2003*), siguen haciendo de los estatines agentes farmacológicos sumamente útiles en el tratamiento de estas patologías.



**FIGURA I.8. Estructura de los estatines y su relación con el ácido mevalónico y su lactona**

## **I.F.2. INHIBIDORES NO COMPETITIVOS DE LA REDUCTASA.**

### **MONOTERPENOS.**

Los monoterpenos son componentes no nutritivos de la dieta presentes en aceites esenciales de frutas cítricas, cerezas, menta, albahaca y otras hierbas aromáticas. Estos compuestos también se encuentran en cereales, como la avena y la cebada. Fisiológicamente actúan como quimioatrayentes o quimiorrepelentes (**McGarvey y Groteau, 1995**) y son responsables de las fragancias que distinguen a muchas plantas. Estos isoprenoides de 10 carbonos, entre los cuales se encuentran el *d*-limoneno, perillil alcohol, mentol y geraniol (fig.1.9.), son derivados del metabolismo del mevalonato en plantas pero no son producidos por mamíferos, hongos u otras especies. Están presentes no sólo en numerosos alimentos, sino que algunos son usados como saborizantes de bebidas o aromatizantes de cosméticos, jabones y otros productos de limpieza. Por lo tanto la exposición de los seres humanos a estos productos, tanto a través de la dieta como del medio ambiente es amplia.

El metabolismo de estos isoprenoides en mamíferos ha sido investigado, comprobándose que exhiben un alto grado de biodisponibilidad oral (**Kodama y col., 1976a, 1976b; Philips y col., 1995**). El limoneno y/o sus metabolitos son detectables en suero, hígado, pulmón y otros tejidos (**Igimi y col., 1974**), con altas concentraciones detectadas en tejido adiposo y glándulas mamarias (**Crowell y col., 1992**). El tiempo de vida medio del limoneno en ratas y humanos se ha estimado en unas 12-24 horas (**Crowell y col., 1992**), y la excreción ocurre principalmente a través de la orina (**Igimi y col., 1974; Kodama y col., 1976a, 1976b**).

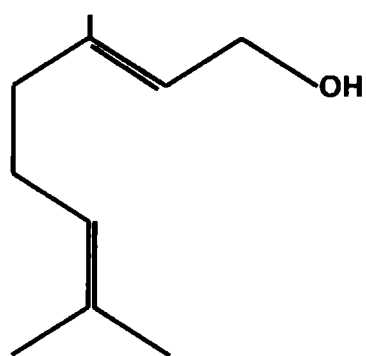
Los monoterpenos suprimen la síntesis de mevalonato y la colesterogénesis. A diferencia de los estatinas, los efectos inhibitorios de estos isoprenoides son mediados por una disminución en la cantidad y actividad de la HMG-CoA reductasa (**Clegg y col., 1982**). Esta regulación se da a nivel post-transcripcional, disminuyendo la velocidad de traducción del ARNm de la reductasa y aumentando la velocidad de degradación de la enzima. Aparentemente esto se logra desviando la vía del mevalonato hacia la producción de productos no esteroides, los cuales

regulan, como ya se explicó anteriormente (ver regulación de la vía del mevalonato), la síntesis de mevalonato a nivel post-transcripcional (**Clegg y col., 1980, 1982**).

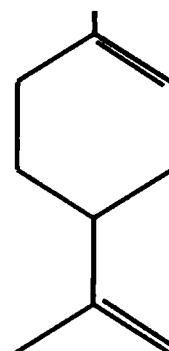
Además de regular la cantidad de reductasa y disminuir los niveles de colesterol sérico (**Qureshi y col., 1988**), los monoterpenos pueden inhibir directamente la isoprenilación de proteínas por acción sobre las prenil-transferasas (**Crowell y col., 1992; Ferri y col., 2001; Holstein y Hohl, 2003**). Sumado a estos efectos, el perill alcohol, ha mostrado ser capaz de inhibir la síntesis de ubiquinona y colesterol en células NIH3T3 en cultivo (**Ren y Gould, 1994**). En este sistema celular la inhibición de la síntesis de colesterol ocurre a nivel de la conversión de lanosterol en colesterol, más allá de la reacción catalizada por la reductasa.

Los efectos de los monoterpenos sobre la síntesis de mevalonato y colesterol se relacionan directamente con su actividad como agentes antitumorales, muchos de ellos han demostrado ser efectivos inhibiendo la proliferación de diversas líneas tumorales *in vitro* (**Karlson y col., 1996; Crowell, 1997; He y col., 1997; Bardon y col., 2002**) y logrando la regresión de distintos tumores *in vivo* (**Elson y Yu, 1994; Yu y col., 1995; He y col., 1997; Raphael y Kuttan, 2003**). La capacidad para inhibir la HMG-CoA reductasa y la carcinogénesis difiere entre un isoprenoide y otro así como la sensibilidad de las distintas líneas tumorales a un isoprenoide determinado.

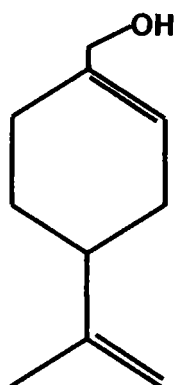
Dado que estos compuestos son productos naturales, hasta el momento no se han reportado efectos colaterales adversos por tratamiento con monoterpenos. Por este motivo podrían ser usados solos o en combinación con estatines, para reducir la concentración de colesterol sérico, disminuyendo así la dosis y los efectos no deseados de los estatines. También se ha propuesto su uso como agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos en las terapias de cáncer (**Bodake y col., 2003**).



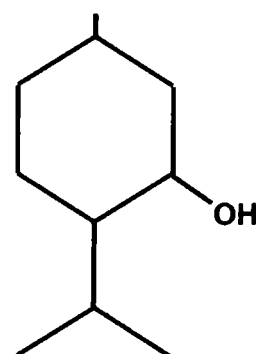
geraniol



d-limoneno



perill alcohol



mentol

**FIGURA I.9. Estructura de los monoterpenos, inhibidores no competitivos de la HMG-CoA reductasa**



## **I.G.OBJETIVOS.**

En los ítems anteriores se ha establecido claramente la importancia de la vía de síntesis del mevalonato y sus derivados esteroides y no esteroides en el crecimiento y la proliferación celular. Ha quedado claro que la regulación de esta vía se logra principalmente controlando la actividad de la HMG-CoA reductasa a distintos niveles, tanto en su síntesis como en su degradación.

También se mencionó que existe una fuerte vinculación entre la colesterogénesis y el metabolismo de ácidos grasos insaturados, dado que las variaciones en el contenido de colesterol celular pueden modificar la expresión de los genes de las distintas desaturasas involucradas en la síntesis de estos ácidos grasos.

Considerando el papel relevante que tienen la síntesis de mevalonato y colesterol en la proliferación celular, tanto en células normales como en células neoplásicas, y atendiendo a la estrecha relación que existe entre la vía del mevalonato y el metabolismo de otros lípidos celulares, los objetivos principales planteados en el desarrollo de esta tesis fueron:

- 1- Estudiar el efecto de distintos inhibidores de la HMG-CoA reductasa sobre el crecimiento y proliferación celular de una línea tumoral no hepática.
- 2- Caracterizar el efecto de estos inhibidores sobre la vía del mevalonato y algunos aspectos del metabolismo de ácidos grasos en esta misma línea celular.

Para desarrollar estos objetivos se utilizó la línea celular A549, proveniente de un adenocarcinoma de pulmón humano.

- 3- Estudiar el modelo de tumor A549/ ratones inmunodeficientes NIH nude desde el punto de vista del crecimiento, composición lipídica e influencia del mismo sobre el metabolismo lipídico del hésped.
- 4- Analizar el efecto *in vivo* de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa estudiados *in vitro* sobre el crecimiento tumoral.

5- Determinar la influencia de estos inhibidores de la reductasa sobre la colesterolemia y el contenido de colesterol y la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del hígado del animal huésped y del tumor.

6- Estudiar el efecto de uno de estos inhibidores en la incorporación y metabolización del mevalonato exógeno en distintos tejidos del huésped.

# CAPITULO II

*MATERIALES Y METODOS*

## MATERIALES Y METODOS

### II.A.MATERIALES UTILIZADOS.

#### II.A.1.DROGAS RADIATIVAS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radiactivos:

1. Mevalonolactona, RS-[5-<sup>3</sup>H(N)]- (sol. etanol)  
24,00 Ci/mmol  
99 % puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA
2. Acido acético, sal sódica [1-<sup>14</sup>C]- (sol. etanol)  
54,0 Ci/mol  
99% puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA
3. Colesterol, [1,2-<sup>3</sup>H(N)]- (sol. etanol)  
51,0 Ci/nmol  
99% puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA
4. Acido palmítico, [1-<sup>14</sup>C]- (sol. etanol)  
55 Ci/mol  
99% puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA
5. Acido  $\alpha$ -linolénico, [1-<sup>14</sup>C]- (sol. etanol)  
53 Ci/mol  
99% puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA
6. Acido dihomo- $\gamma$ -linolénico, [1-<sup>14</sup>C]- (sol. Etanol)  
52 Ci/mol  
99% puro  
New England Nuclear Corp., Boston MA

## **II.A.2.DROGAS NO RADIATIVAS.**

### **Solventes:**

Acetona

Acido acético

Acido clorhídrico

Acido sulfúrico

Cloroformo

Dimetil Sulfóxido

Dioxano

Etanol absoluto

Eter de Petróleo

Eter Eílico

Metanol

Todos los solventes aquí detallados fueron calidad pro-análisis y adquiridos a Merck Química Argentina.

### **Sustancias para centelleo líquido:**

Fluorescente primario: 2,5-difeniloxazol (PPO)

Centellador secundario: 1,4-bis-(5-t-butylbezooxazol-2-il)-tiofeno (POPOP)

Ultima Gold XR

Ambas drogas y el líquido de centelleo se adquirieron a Packard Instrument Company, Illinois, USA.

### **Fases para cromatografía gas líquido:**

En cromatografía de ésteres metílicos de ácidos grasos radiactivos se utilizó como fase estacionaria el relleno "SP-2330" en Chromosorb WAW-DMCS 100 a 200 mallas.

En cromatografía de ésteres metílicos de ácidos grasos no radiactivos se utilizó como fase estacionaria Omegawax 250.

Las fases fueron adquiridas a Supelco Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.

### **Elementos para cromatografía en capa fina:**

Para la separación de lípidos insaponificables se utilizaron placas de vidrio (20 x 20 cm) recubiertas con silicagel G sin fluorescente marca Merk, Alemania.

### **Estándares:**

Albúmina sérica bovina (fracción V)

Colesterol

Palmitoil colesterol

Los estándares utilizados fueron todos adquiridos a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.

### **Cofactores enzimáticos:**

ATP

Coenzima A

NADH

Fueron adquiridos a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.

### **Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa:**

El Simvastatin fue gentilmente provisto por Merck, Sharp & Dohme, Argentina.

El Geraniol fue adquirido a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.

**Gases:**

Todos los gases utilizados en el trabajo experimental fueron adquiridos a AGA, La Plata, Argentina.

El Nitrógeno (purísimo), Hidrógeno (purísimo), Helio (purísimo) y Aire (purísima) empleados en cromatografía gas-líquido se secaron sobre tamices moleculares de perclorato de potasio activados a 600 °C.

**Drogas varias:**

La preparación de soluciones madres empleadas en los medios utilizados en el cultivo de células, en el procesamiento de tejidos y células y en las determinaciones de actividad enzimática se llevó a cabo con drogas provenientes de las siguientes fuentes comerciales:

Sales inorgánicas, sacarosa, glucosa, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), Imidazol y rojo de fenol: Mallinkrodt, New York, U.S.A.

Glicerol y aminoácidos: Carlo Erba, Milán, Italia.

Vitaminas: Abbott Lab., Argentina.

HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etanosulfónico) y glucosa-6-fosfato: Sigma Chem. Comp., St. Louis, U.S.A.

Reactivo de Folin-Cicolteau y ácido tricloroacético: Merck, de Alemania.

Estreptomina (sulfato): Laboratorio Lepetit, Buenos Aires, Argentina.

Suero fetal estéril obtenido de Gen S.A., Buenos Aires, Argentina.

Otras drogas empleadas en la realización de este trabajo se obtuvieron de fuentes comerciales reconocidas y fueron de grado pro-análisis o RPE.

## **II.B.METODOLOGIA.**

### **II.B.1.METODOLOGIA GENERAL.**

#### **II.B.1.a.Obtención de lípidos totales y separación de lípidos neutros y fosfolípidos.**

Los lípidos totales de células, plasma y tejidos fueron extraídos empleando el método de Folch y col (*Folch y col., 1957*). Se utilizó una mezcla de solventes de extracción cloroformo:metanol (2:1 v/v), en una relación 20:1 (v/v ó v/p dependiendo que la muestra sea una solución o tejido disgregado). Se agitó vigorosamente y se mantuvo a 4°C toda la noche. Luego se filtró por papel de filtro Whatman, lavando con solvente de extracción. Al filtrado se le agregó un 20% de su volumen de agua, se agitó y se dejó decantar para permitir la separación de las fases obteniéndose así una fase acuosa metanólica y una fase lipídica, clorofórmica.

Las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos de la fase clorofórmica fueron separadas por cromatografía en micro-columna con sílica de acuerdo al método descrito por Hanahan y col. (*Hanahan y col. 1957*).

#### **II.B.1.b.Extracción de lípidos insaponificables y ácidos grasos de lípidos totales.**

En varias oportunidades fue necesario extraer los lípidos insaponificables totales de plasma, tejidos y microsomas hepáticos de ratones nude, y de células A549 para separarlos posteriormente por cromatografía en capa fina o bien cuantificar el contenido de colesterol también por cromatografía en capa fina. En algunos casos también fueron extraídos los ácidos grasos totales de células y tejidos, para luego derivatizarlos a ésteres metílicos y analizar la composición por radio GLC.

La extracción de lípidos insaponificables y de ácidos grasos totales requiere la saponificación previa de las muestras que se logra tratándolas con álcali para hidrolizar los ácidos grasos de los ésteres de colesterol, acilglicéridos y



fosfoglicéridos y convertirlos en jabones insolubles en solventes orgánicos poco polares, usados para la extracción de lípidos.

Para ello se tomaron alícuotas de cada uno de los distintos materiales biológicos, se les agregó una solución de KOH al 10% en etanol absoluto (libre de carbonatos) en una proporción de 8 ml por g de lípido, se gasearon con nitrógeno para evitar oxidaciones y en recipientes bien tapados se los calentó a 80°C durante 45 min. (*Haeffner y col., 1984*). Los lípidos insaponificables fueron extraídos por agitación de la fase acuosa con 2 ml de éter de petróleo (p.e.: 30-50 °C), repitiendo esta operación tres veces. Completada la extracción de lípidos insaponificables se acidificó el medio con HCl pro-análisis para desplazar el equilibrio hacia la formación de ácidos grasos, los cuales fueron extraídos por agitación de la fase acuosa con 2 ml de éter de petróleo tres veces. Tanto en el caso de los lípidos insaponificables como en los ácidos grasos los extractivos etéreos se reunieron en tubos cónicos de vidrio, con cuello y tapa esmerilados. Estos extractivos fueron almacenados bajo atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad y a -20°C, hasta el momento de su análisis, sin detectarse en estas condiciones la formación de productos de oxidación.

### **II.B.1.c. Derivatización de ácidos grasos.**

Los ácidos grasos libres provenientes de la saponificación de los lípidos totales o de la fracción de fosfolípidos fueron metilados de acuerdo a la metodología desarrollada por Morrison y Smith (*Morrison y Smith, 1964*) con BF<sub>3</sub>/metanol, calentando 1 hora a 80°C bajo atmósfera de nitrógeno.

### **II.B.1.d. Identificación de ácidos grasos de fosfolípidos por cromatografía gas-líquido.**

Los EMAG fueron analizados en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama, sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific) de 30 m de largo. Las condiciones de uso fueron las siguientes:

Fase fija	Omegawax 250 (Supelco)
Gas portador	He
Flujo de gas	0,7 ml/min
Temp. de la cabeza de inyección	260°C
Temp. Inicial del horno (T1)	175°C
Tiempo inicial a T1	3 min
Temp. Final del horno (T2)	230°C
Tiempo final a T2	19min
Incremento de temp.	3°C/min.

El método de identificación de los EMAG se basó en el tiempo de retención relativo, que es característico de cada ácido graso, dependiente de la columna usada, de la fase móvil y de la temperatura, e independiente de otras condiciones experimentales. Los picos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla de estándares de EMAG conocidos.

### **II.B.1.e. Identificación y cuantificación de <sup>14</sup>C-EMAG por radio GLC.**

La distribución de la radiactividad entre los EMAG derivados de la metabolización de los distintos ácidos grasos radiactivos incorporados, fue analizada en un radio cromatógrafo Varian Star 3400 CX en tándem con un detector gaseoso (GC-Ram; Inus System Inc. Tampa, FL), utilizando una columna de vidrio

rellena con "SP-2330" al 10% (p/p) en Chomosorb WAW-DMCS de 100-200 mallas (Supelco Inc., Bellefonte, PA). Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Temp.inicial del horno (T1)	170°C
Tiempo a T1	1 min.
Incremento de temp.	1°C/min
Temp. media del horno (T2)	190°C
Tiempo a T2	1 min.
Incremento de temp.	3°C/min.
Temp. final del horno (T3)	220°C
Tiempo a T3	10 min.

Los EMAG fueron identificados comparando sus tiempos de retención relativos con los de una mezcla de estándares conocidos, mientras que la distribución de la radiactividad fue calculada electrónicamente por cuantificación del área de los picos.

#### **II.B.1.f.Cuantificación de colesterol libre y ésteres de colesterol por cromatografía en capa fina (TLC)**

El colesterol libre y colesterol esterificado de células y tejidos fue separado por TLC (ítem II.A.2.), usando como solvente de corrida hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1, por vol.). Las manchas correspondientes a colesterol o ésteres de colesterol fueron visualizadas por el método de cloruro férrico de Lowry (*Lowry y col., 1968*). Las manchas fueron cuantificadas por comparación con curvas construidas utilizando estándares comerciales (1-10 µg). Después del "manchado", las placas fueron escaneadas y se realizó una cuantificación por densidad utilizando un Software de análisis de imágenes unidimensional (Kodak, Rochester, NY) para exposiciones múltiples.

### **II.B.1.g.Cuantificación de fósforo total**

El contenido de fósforo proveniente de la extracción de lípidos totales o de fosfolípidos de células o tejidos se cuantificó por el método de Chen y col. (*Chen y col., 1956*), construyendo una curva de calibración con estándares comerciales.

### **II.B.1.h.Separación de lípidos insaponificables radiactivos por TLC.**

Para la separación del colesterol y sus precursores se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm descritas en el ítem II.A.2. La fase móvil fue cloroformo 100 %. La cuba de desarrollo conteniendo el solvente de corrida se saturó previamente con los vapores del mismo.

Una vez desarrolladas las placas, se secaron en atmósfera de nitrógeno y se rasparon cada 0,5 cm para determinar la radiactividad incorporada. Si bien la separación de lípidos por TLC no permite la identificación exacta de los mismos, permite comparar los  $R_F$  con estándares que se siembran simultáneamente

Los lípidos insaponificables separados fueron (valor de  $R_F$  entre paréntesis): colesterol (0,34), lanosterol (0,52), dolicol (0,60), ubiquinona (0,70) y escualeno (0,81). La técnica utilizada se ajustó a la descrita por Maltese y Aprille y por Maltese y Sheridan (*Maltese y Aprille, 1985; Maltese y Sheridan, 1985*).

### **II.B.1.i.Obtención de fracciones acuosas, proteicas y lipídicas de células y tejidos:**

Para la obtención de las distintas fracciones tanto celulares como de tejidos se tomaron alícuotas de la suspensión celular o del homogenato de tejidos obtenidos luego del correspondiente procesamiento de las muestras biológicas, descrito en los ítems III.C y IV.B.3. Las alícuotas fueron procesadas de acuerdo a la técnica descrita por Maltese y Sheridan (*Maltese y Sheridan, 1987*). Se les adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) frío en cantidad adecuada de acuerdo al volumen de muestra incubándolas durante 30 min. en hielo. El material

precitado se centrifugó 20000 x g durante 20 min. y el sobrenadante acuoso se recogió en tubos de vidrio. El precipitado se lavo 2 veces con TCA 10% (p/v) frío, centrifugando a 20000 x g durante 20 min. después de cada lavado, todos los sobrenadantes acuosos fueron colectados en el mismo tubo, obteniéndose así lo que se denominó Fracción Acuosa.

El pellet fue delipidizado mediante una extracción secuencial con acetona, cloroformo/metanol (2:1, v/v) y etanol fríos de acuerdo a como lo describen Schmidt y col. (*Schmidt y col., 1984*). El producto de la delipidización se denominó Fracción Lipídica.

El material insoluble proveniente de la precipitación con TCA fue solubilizado con KOH 1 N a 60°C, en agitación, hasta obtener una solución límpida, esta solución fue neutralizada con HCl 1N. La solución obtenida se corresponde con la denominada Fracción Proteica.

Las tres fracciones así obtenidas se procesaron posteriormente según se describe en los ítems III.C y IV.B.3.

### **II.B.1.j. Incorporación de [<sup>3</sup>H]-mevalonolactona en fracciones celulares o de tejidos.**

El material radiactivo se adicionó directamente al medio de cultivo, según se describe en III.C., o se inyectó a los animales según IV.3. Luego de transcurrido el tiempo indicado en cada uno de estos ítems y una vez obtenidas las fracciones acuosa, lipídica y proteica de células o tejidos (ver II.B.1.i.), se determinó la radiactividad incorporada por centelleo líquido. Los conteos de radiactividad se efectuaron en viales de vidrio o de plástico, conteniendo 10 ó 2,5 ml de líquido de centelleo respectivamente. El líquido de centelleo utilizado para la fracción lipídica contiene 100 mg de POPOP y 4 gr de PPO cada 1000 ml de tolueno (*Cooper, 1984*). Para las fracciones acuosa y proteica se utilizó un líquido de centelleo comercial (ULTIMA GOLD XR, Packard).

Cada vial se contó durante 1 min. Se utilizó un contador de centelleo líquido Wallac 1214 RackBeta (Pharmacia, Turku, Finland).

### **II.B.1.k.Obtención de sal sódica de Simvastatin.**

El Simvastatin es normalmente administrado bajo la forma de lactona insoluble en agua y en el intestino delgado con el pH alcalino se transforma en la forma aniónica activa y es absorbido. Dado que en los experimentos realizados la droga fue incorporada al medio de cultivo celular o suministrada a los animales a través del agua de bebida, fue necesario transformarla previamente en su forma aniónica para poder solubilizarla. Se utilizó la técnica descrita por Sebti y col. para obtener sal sódica de Lovastatin (**Sebti y col., 1991**) levemente modificada. Se disolvió el Simvastatin en etanol absoluto a 60 °C y se adicionó una cantidad equimolar de NaOH. Después de 1 hora de calentamiento a 60 °C, se evaporó el etanol bajo corriente de N<sub>2</sub> y la sal sódica de Simvastatin así obtenida fue disuelta en agua esterilizada a una concentración final apropiada.

### **II.B.2.METODOLOGIA ESPECIFICA UTILIZADA PARA EL CULTIVO DE CELULAS.**

#### **II.B.2.a.Cultivo de células tumorales en monocapa.**

Se trabajó con la línea tumoral A549 proveniente de un carcinoma humano de células alveolares. El tejido utilizado originalmente para comenzar esta línea tumoral, provino de una lobectomía practicada en 1972 a un hombre de 58 años, caucásico, con historia de dolor de pecho, expectoraciones sanguinolentas y pérdida de peso. Las radiografías de pecho revelaron una masa en el lóbulo inferior derecho del pulmón. En la cirugía se extrajo un tumor de aproximadamente 6 x 5 x 1 cm., a partir del cual se estableció la línea celular (**Giard y col., 1973**).

Las células A549 se comportan como una línea celular transformada presentando los criterios de crecimiento *in vitro* tradicionales: formación de colonias en agar blando y crecimiento sobre monocapas de fibroblastos. Crecen como una monocapa, con un tiempo de duplicación de 48 horas en fase logarítmica de crecimiento, alcanzando esta fase a las 48 horas de ser repicadas. El análisis cromosómico es anormal, el número de cromosomas varía entre 64 y 68 y

contienen un cromosoma dicéntrico distintivo, las células tienden a perder su cromosoma Y con los pasajes sucesivos (*Giard y col., 1973*).

La morfología celular se corresponde con las células epiteliales, presentando numerosos gránulos citoplasmáticos, visibles con microscopía de campo claro o de fase.

El patrón de síntesis de fosfolípidos en estas células es el esperado para células de tipo II sintetizadoras de surfactante pulmonar (*Lieber y col., 1976*).

La inyección de la línea celular A549 en ratones inmunosuprimidos o ratones nude atímicos causa el crecimiento progresivo de tumores (*Giard y col., 1973*).

Esta línea tumoral la obtuvimos por una donación de la Dra. Amada Segal-Eiras (Directora del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas de la UNLP). Los cultivos de esta línea tumoral se realizaron predominantemente en botellas cerradas de vidrio blando de 75 cm<sup>2</sup> de superficie de pegado (tipo Khole).

El medio de cultivo utilizado fue el Esencial Mínimo de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés) con sales de Earle y piruvato de potasio, y suero fetal bovino al 10 % inactivado (*Aden y col., 1979*). El medio de cultivo, cuya composición se muestra en la Tabla II.1., fue preparado en el laboratorio. La esterilización del mismo se realizó haciendo pasar el medio a través de filtros Sartorius de 0,22 μm de diámetro de poro, esterilizados previamente con calor húmedo. El suero fetal bovino estéril se obtuvo de la empresa Gen S.A. El mismo se inactivó calentándolo a 56°C en baño termostático durante 1 hora. Una vez inactivado, se agregó al medio estéril y el medio completo se fraccionó en botellas de vidrio que se guardaron en heladera (4°C).

Los subcultivos se realizaron despegando las células de la pared de la botella con una solución salina isotónica de tripsina estéril al 0,25 %. Luego, las células despegadas se resuspendieron en medio MEM, y una alícuota (cociente de dilución 1:5) se transfirió a botellas de cultivo estériles. La actividad enzimática de la tripsina se inhibió por el agregado de medio de cultivo, y se llevaron a un incubador para cultivo celular marca Bergman, de Alemania. Las células se incubaron a 37°C. Los subcultivos se realizaron cada siete días.

Todas las operaciones de cultivo se efectuaron en un banco de flujo laminar estéril marca "Filtrar", clase 10.000, adquirido a Pregliasco S.R.L., Buenos Aires, Argentina.

El estado de las monocapas se controló en forma periódica por microscopía y pruebas microbiológicas. Los subcultivos suministraron material para mantenimiento de la línea y experimentación. Parte de las células fueron conservadas por crionización en aire líquido, utilizándose glicerol al 10 %, en MEM suplementado con 20% de SFB, como agente anticongelante.



Tabla II.1.

**Composición del Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle con sales Earle y aminoácidos no esenciales**

<u>Componentes:</u>	<u>Concentración (gramos / litro)</u>
<u>SALES INORGÁNICAS:</u>	
Cloruro de Calcio 2H <sub>2</sub> O	0,2650
Sulfato de Magnesio (Anhidro)	0,1000
Cloruro de Potasio	0,4000
Cloruro de Sodio	6,8000
Fosfato Monobásico de Sodio (Anhidro)	0,1250
Bicarbonato de Sodio	2,2000
<u>AMINOÁCIDOS:</u>	
L-Alanina	0,0089
L-Arginina HCl	0,1260
L-Asparagina H <sub>2</sub> O	0,0150
L-Ácido Aspártico	0,0133
L-Cistina 2HCl	0,0313
L-Ácido Glutámico	0,0147
L-Glutamina	0,2920
Glicina	0,0075
L-Histidina HCl H <sub>2</sub> O	0,0420
L-Isoleucina	0,0520
L-Leucina	0,0520
L-Lisina HCl	0,0725
L-Metionina	0,0150
L-Fenilalanina	0,0320
L-Prolina	0,0115
L-Serina	0,0105
L-Treonina	0,0480
L-Triptofano	0,0100
L-Tirosina (Disódica)	0,0519
L-Valina	0,0460
<u>VITAMINAS:</u>	
Cloruro de Colina	0,0010
Ácido Fólico	0,0010
mio-Inositol	0,0020
Niacinamida	0,0010
D-Ácido Pantoténico (Calcio)	0,0010
Piridoxal HCl	0,0010
Riboflavina	0,0001
Tiamina HCl	0,0010
<u>OTROS:</u>	
Glucosa	1,0000
Rojo de Fenol	0,0110
Piruvato de Sodio	0,1100

El pH del medio a 25°C es  $7,5 \pm 0,3$  y la osmolaridad expresada en mOsm/Kg H<sub>2</sub>O es  $297 \pm 5\%$ .

En los experimentos en los que fue necesario el uso de medio sin suero, se utilizó medio IMEM Zo, inicialmente concebido por Richter para el crecimiento de

células HTC en medios carentes de suero (*Richter y col., 1972*). En nuestro caso hemos omitido el agregado de ácido linoleico e incorporamos HEPES a concentración 10 mM. La composición final aparece en la Tabla II.2. donde es posible observar que es un medio químicamente definido, libre de fuentes lipídicas y con considerable capacidad buffer.

### **II.B.2.b. Recuento de células y estimación de la viabilidad celular.**

Los procedimientos seguidos para la preparación de células A549 permitieron la obtención de poblaciones homogéneas con elevada viabilidad y reproductibilidad de comportamiento metabólico.

Las suspensiones de células cultivadas en monocapa se contaron en un hemocitómetro del tipo Neubauer, efectuando diluciones apropiadas a la densidad celular de modo tal de obtener unas 100 células por cuadrante mayor.

La estimación de la viabilidad celular se efectuó por medio del test de exclusión de azul tripán (solución isotónica al 0,2%) (*Phillips, 1973*). Este test rutinariamente indicó que el 90% o más de las células se encontraban en condiciones adecuadas de viabilidad.

Se ha establecido fehacientemente que el test de exclusión de azul tripán se correlaciona muy bien con otras pruebas de viabilidad celular tales como la fuga de lácticodeshidrogenasa, consumo de glucosa, captación de aminoácidos marcados a material tricloroacético-insoluble o microscopía electrónica (*Wanson, 1976; Weigand, 1976; Jauregui y col., 1981*).

**Tabla II.2.****Composición del Medio IMEM Zo (modificado)**

<u>Componentes:</u>	<u>Concentración (gramos / litro)</u>
<b><u>SALES INORGÁNICAS:</u></b>	
Cloruro de Calcio	0,26500
Sulfato de Magnesio	0,02500
Cloruro de Potasio	0,40000
Cloruro de Sodio	6,80000
Fosfato Monobásico de Sodio	0,15000
Cloruro de Magnesio	0,18500
Cloruro Férrico	0,00050
Sulfato de Zinc	0,00014
<b><u>AMINOÁCIDOS:</u></b>	
L-Arginina	0,12700
L-Asparagina	0,06000
L-Cistina	0,02400
L-Histidina	0,04190
L-Isoleucina	0,05200
L-Leucina	0,13220
L-Lisina	0,07200
L-Metionina	0,01500
L-Fenilalanina	0,03200
L-Serina	0,04200
L-Treonina	0,04800
L-Triptofano	0,01000
L-Tirosina	0,03600
L-Valina	0,04600
<b><u>VITAMINAS:</u></b>	
Cloruro de Colina	0,05600
mio-Inositol	0,03600
Pantotenato de Calcio	0,00100
Fosfato de Piridoxal	0,00100
Riboflavina	0,00010
Tiamina	0,01000
Vitamina B <sub>12</sub>	0,00136
D-Biotina	0,00010
Niacinamida	0,00100
<b><u>OTROS:</u></b>	
Glucosa	2,00000
Piruvato de Sodio	0,11000
Ácido Tioctico	0,00020
Putrescina	0,00016
Estreptomina	0,10000

Principales modificaciones introducidas a la formulación original: eliminación de las sales de cobalto, disminución de la concentración de calcio y de bicarbonato de sodio, omisión del agregado de ácido linoleico e introducción del HEPES como sistema buffer principal. El pH del medio se ajustó a 7,3-7,4.

### **II.B.2.c.Determinación de proteína celular total.**

El dosaje de la proteína celular total (PCT) en suspensiones de células A549 se llevó a cabo utilizando una técnica semejante a la descrita por Patterson (*Patterson, 1979*) para lo cual una porción de la suspensión celular se centrifugó a baja velocidad (1500 x g, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El pellet celular se resuspendió en un pequeño volumen de solución fisiológica (usualmente 200  $\mu$ l) y se sometió a digestión con reactivo "C" de Lowry. La disgregación celular se completó a 37°C en 60 min. o a temperatura ambiente en 10-12 horas. El proceso pudo ser fácilmente controlado por observación al microscopio óptico. De este digerido alcalino translúcido, se tomaron alícuotas apropiadas y se aplicó la microtécnica de Lowry (*Lowry y col., 1951*).

En todos los casos, los cálculos se efectuaron mediante un coeficiente de calibración obtenido de la pendiente de una curva standard. Como solución estándar de proteína se utilizó albúmina sérica bovina (fracción V) en NaOH 0,10 N, a concentración 0,5 mg/ml.

### **II.B.2.d.Incorporación de sustratos exógenos radiactivos.**

#### **II.B.2.d.1.Incorporación de acetato [ $1-^{14}\text{C}$ ] en lípidos insaponificables y ácidos grasos de células:**

El material radiactivo (30  $\mu$ Ci/botella), solución etanólica, se agregó al medio de incubación directamente. Se incubó por un período de 24 horas y se separaron las células del medio. Se extrajeron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos totales en la forma que se describe en el ítem II.B.1.b. y se determinó la radiactividad total incorporada en estos lípidos tomando alícuotas (usualmente de 50 y 100  $\mu$ l) que se contaron por duplicado. Los distintos componentes del insaponificable fueron separados por TLC como se describe en el ítem II.B.1.h., la placa fue raspada cada 0,5 cm, determinándose la radiactividad total incorporada en colesterol y precursores.

Los ácidos grasos fueron derivatizados a sus ésteres metílicos correspondientes (ver II.B.1.c) y analizados en un radio cromatógrafo (ver II.B.1.e).

#### **II.B.2.d.2.Incorporación de colesterol [1,2-<sup>3</sup>H(N)] en células A549:**

El material radiactivo (10  $\mu$ Ci/botella), solución etanólica, se adicionó directamente al medio. Se incubó durante 1 hora en presencia de la sonda radiactiva. Para determinar la radiactividad incorporada las células fueron lavadas y cosechadas. Los lípidos insaponificables fueron extraídos con éter de petróleo (ver II.B.1.b.) y se determinó la radiactividad presente en los mismos.

#### **II.B.2.d.3.Incorporación de [1-<sup>14</sup>C]ácidos grasos:**

Los ácidos grasos marcados radiactivamente (10 nmoles/botella) fueron adicionados como sal sódica complejados con albúmina delipidizada de acuerdo a la metodología descrita por Spector y col. (*Spector y col., 1965*). Se incubó durante 24 horas en presencia de la sonda radiactiva. Para determinar la radiactividad incorporada las células fueron lavadas y cosechadas. Se extrajeron los ácidos grasos totales, previa saponificación de las muestras, de acuerdo a lo descrito en el ítem II.B.1.b. y se determinó la radiactividad total incorporada en estos lípidos.

Finalmente los ácidos grasos fueron derivatizados a sus ésteres metílicos correspondientes (ver II.B.1.c) y analizados por radio GLC (ver II.B.1.e.).

En todos los casos los conteos de radiactividad se efectuaron en viales de vidrio o de plástico, conteniendo 10 ó 2,5 ml de líquido de centelleo respectivamente. Cada 1000 ml de tolueno, el líquido de centelleo contiene 100 mg de POPOP y 4 gr de PPO (*Cooper, 1984*). Cada vial se contó durante 1 min. Se utilizó un contador de centelleo líquido Wallac 1214 RackBeta (Pharmacia, Turku, Finland).

Los cálculos finales se refirieron siempre al valor medio de las desintegraciones por minuto registradas en el material biológico analizado por mg de proteína celular total  $\pm$  1 desviación estándar.

### **II.B.3.METODOLOGIA ESPECIFICA UTILIZADA PARA TUMOR HUMANO HETEROTRANSPLANTADO.**

#### **II.B.3.a.Mantenimiento de los animales.**

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones NIH hembras portadores del genotipo nu/nu. Se trata de ratones mutantes sin pelo que fueron observados por primera vez en 1962 por el Dr. N.R. Grist en Glasgow, Escocia. La genética de la mutación fue descrita por S.P. Flagan (*Flagan, 1966*) quien confirmó que la falta de pelo está determinada por un gen autosómico recesivo al cual denominó nude (desnudo), símbolo *nu*. En 1968 el Dr. E.M. Pantelouris descubrió la condición atímica de los nude (*Pantelouris, 1968*). En cuanto a la asociación de la condición atímica y la ausencia de pelaje, la evidencia acumulada sugiere que se trata de una mutación con múltiples efectos o *Pleiotropismo*. La asociación de estos rasgos facilita el manejo de la colonia de animales permitiendo distinguir la progenie homocigota sin necesidad de un extenso monitoreo.

Dada la condición atímica y la inmunodeficiencia que esto trae aparejada, los homocigotas (nu/nu) son susceptibles a patógenos que los ratones normales toleran sin inconvenientes. La consecuencia directa es la necesidad de proveer un entorno protegido que asegure una supervivencia suficientemente prolongada para permitir la reproducción y el desarrollo de protocolos experimentales.

Animales de aproximadamente un mes de edad, gentilmente provistos por la Dra. Cecilia Carbone del Bioterio de la Fac. de Cs. Veterinarias de la UNLP, fueron criados en nuestro bioterio que se halla especialmente equipado para garantizar las condiciones óptimas de asepsia requeridas, en ambiente climatizado y con ciclos de luz (6 a.m. a 6 p.m.) y oscuridad (6 p.m. a 6 a.m.) controlados en forma automática.

Los animales fueron alimentados "ad libitum" con una dieta estándar de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma (rango de dosis 1-10

kGy o kilo Gray, que equivale a la absorción de un joule de energía por kilo de masa irradiada. Realizada en la planta de irradiación IONICS, El Talar, Buenos Aires, Argentina. La composición se detalla en la Tabla II.3. Se les permitió libre acceso al consumo de agua acidulada (pH: 3) esterilizada en autoclave.

**Tabla II.3.****Composición de la dieta suministrada a ratones "nude"**

	mg / g de alimento
Carbohidratos	735,3
Proteínas	427,5
Lípidos Totales	60,2
Colesterol Total	2,3

**Composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en la dieta**

Ácido graso	Porcentaje (moles %)
14:0	0,2
16:0	11,8
16:1	0,5
18:0	3,3
18:1	20,5
18:2n-6	50,8
18:3n-3	7,3
20:4n-6	0,3
20:4n-3	0,7
20:5n-3	0,7
22:5n-3	0,7
22:6n-3	1,1

No se encontraron diferencias significativas entre diferentes partidas de alimento. Los resultados indicados corresponden a un análisis tipo.



### **II.B.3.b.Desarrollo y mantenimiento del tumor humano en ratones “nude”.**

La condición atímica de los ratones “nude” conduce a un profundo deterioro de la inmunidad mediada por células lo cual permite la aceptación de heterotransplantes (*Rygaard, 1969; Manning y col.,1973*) y transforma a estos animales en huéspedes ideales para el desarrollo de líneas tumorales humanas. De hecho desde que, en 1969, se llevó a cabo el primer heterotransplante exitoso de un tumor de colon humano obtenido por cirugía (*Rygaard, 1969*), la lista de tumores humanos desarrollados y transplantados seriadamente en ratones “nude” es muy amplia.

En este trabajo se utilizó un tumor derivado de la línea celular A549. Para desarrollarlo las células fueron resuspendidas en MEM e implantadas en el espacio interescapular de ratones NIH “nude”, observándose desarrollo local entre 15 y 30 días después del implante primario.

El tumor fue mantenido por repiques sucesivos en ratones nude, realizados cada dos meses. Para efectuar cada uno de los repiques de mantenimiento el tumor fue removido quirúrgicamente, se lavó con MEM más 10% de SFB estéril y se eliminaron regiones necrosadas (observadas frecuentemente en el centro de la masa tumoral probablemente por insuficiente vascularización). Posteriormente se adicionó más medio, se cortó el tumor con tijera y se disgregó el tejido haciéndolo pasar por una malla de acero de 1 mm<sup>2</sup> obteniéndose una suspensión de tejido conteniendo aproximadamente 300 mg de tejido/ml. Finalmente, cada animal fue inoculado subcutáneamente con 0,2 ml de suspensión de tejido.

En todos los casos en los que el implante resultó exitoso el desarrollo de tumores pudo ser reconocido entre los 25 y 30 días siguientes a la inoculación. El tumor incrementó progresivamente su tamaño, llegando a alcanzar dimensiones considerables (mayores a los 4 g). El tiempo de duplicación en masa registrado en fase logarítmica de crecimiento es de 8-10 días.

### **II.B.3.c. Medida de las dimensiones tumorales.**

Cuando los tumores implantados se tornaron palpables fueron medidos al menos dos veces por semana con calibres y el volumen tumoral fue calculado usando la fórmula de un elipsoide:  $V = a^2 \cdot b/2$  donde a y b son el ancho y el largo del tumor respectivamente, ambos expresados en milímetros. El tamaño de los tumores fue expresado como volumen tumoral relativo. Este fue calculado por la fórmula  $V_i/V_o$ , donde  $V_i$  es el volumen tumoral medido a un determinado tiempo y  $V_o$  es el volumen tumoral medido al inicio de cada experimento (*Houchens, 1978*).

### **II.B.3.d. Obtención de microsomas de hígado y tumor.**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removieron rápidamente los hígados y tumores. Trabajando sobre hielo se les eliminó los tejidos extraños y fueron lavados, pesados y homogeneizados siguiendo la proporción de 3 ml de solución homogeneizadora por gramo de tejido húmedo. El proceso de homogeneizado se realizó en forma mecánica empleando un homogeneizador Kontes vidrio-teflón de 15 ml de capacidad, accionado con un equipo Tri-R-Stir-R (modelo S-63C).

La composición de la solución homogeneizadora utilizada fue la siguiente: sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, N-acetil cisteína 1,46 mM,  $MgCl_2$  5 mM, buffer fosfato (pH 7,4) 0,04 M, NaF 0,04 M.

La fracción microsomal se obtuvo por centrifugación diferencial. El homogenato crudo se centrifugó a 12.000 x g durante 20 min. en una centrífuga Sorvall modelo RC5C (rotor SS-34), a 4°C. El pellet consistente en restos celulares, núcleos y mitocondrias, se descartó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 60 min. en una ultracentrífuga Beckman modelo LB 70M, rotor 70 Ti, mantenida a 1-4°C. Se desechó el sobrenadante y se obtuvo el pellet de microsomas (*Brenner y Peluffo, 1966; Catalá y col., 1975*). El pellet microsomal así obtenido se almacenó a -80°C.

La concentración de proteína fue determinada de acuerdo al método de Lowry y col. (*Lowry y col., 1951*). En todos los casos, los cálculos se efectuaron mediante

un coeficiente de calibración obtenido de la pendiente de una curva standard. Como solución estándar de proteína se utilizó albúmina sérica bovina (fracción V) en NaOH 0,10 N, a concentración 0,5 mg/ml.

### II.B.3.e. Ensayo de actividad $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturante

Las actividades  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas fueron determinadas en microsomas hepáticos y tumorales utilizando como sustratos [ $1-^{14}\text{C}$ ] ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3 n-6) o [ $1-^{14}\text{C}$ ] ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) diluidos a una actividad específica de 4,2 mCi/mmol con los correspondientes ácidos grasos puros no marcados. Los ácidos (16,6 nmoles) fueron incubados con 1,25 mg de proteína microsomal hepática o 1 mg de proteína microsomal tumoral en un incubador Dubnoff a 37°C durante 10 min, el volumen final de reacción fue 0,5 ml. La mezcla de reacción consistió en: sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, *N*-acetil cisteína 1,46 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,1M y buffer fosfato (pH 7,4) 0,04 M, NaF 0,04 M, ATP 1,3 mM, coenzima A 0,06 mM y NADH 0,87 mM. La reacción de desaturación se detiene con el agregado de 1 ml de KOH 10% (p/v) en etanol, finalmente la mezcla de reacción fue saponificada y se extrajeron los ácidos grasos libres (*Garda y col., 1992*). Estos ácidos grasos fueron derivatizados a sus respectivos ésteres metílicos y se analizó el porcentaje de conversión por radio GLC (*Albino y col, 2001*).

### II.B.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados experimentales se encuentran expresados como el promedio de al menos 3 determinaciones  $\pm 1$  desviación estándar (DE).

Cuando se compararon sólo dos grupos, las hipótesis estadísticas se ensayaron mediante el test "t" de Student. Mientras que, en algunos casos en los cuales se pretendió conocer la pertenencia o no de varias medias a un mismo universo, se aplicó el método de análisis de varianza (ANOVA) seguido del test "t" de Tukey. En ambos casos se utilizó un nivel de significación para errores de tipo I de 0,05 a 0,01 (95 a 99 % de confianza). Para aquellas diferencias de medias en las cuales el estadístico t quedó comprendido en el intervalo de confianza impuesto por

un valor de  $\alpha = 0,01$  (o menor), la decisión se la consideró altamente significativa. Para  $\alpha = 0,05$  se la consideró significativa y para valores de  $\alpha > 0,05$  no significativa.

Las rectas de calibración de técnicas de uso rutinario se ajustaron mediante el método de cuadrados mínimos. Cada recta se estudió por regresión determinándose coeficientes de correlación lineal.

# CAPITULO III

*EFECTO DE INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE  
COLESTEROL SOBRE EL METABOLISMO  
LIPIDICO DE CELULAS A549*

## **EFFECTO DE INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN CELULAS NEOPLASICAS EN CULTIVO: INHIBICION DEL CRECIMIENTO CELULAR.**

Como se mencionó en la introducción, las transformaciones malignas carecen del mecanismo de inhibición tipo "feedback" ejercido por el colesterol sobre su propia síntesis. (*Siperstein y Fagan, 1964; Siperstein y col., 1971; Erickson y col., 1988; Cuthbert y Lipsky, 1991; Bennis y col., 1993; Hentosh y col, 2001; Singh, 2003*). Las células cancerosas parecen requerir una mayor cantidad de colesterol o sus precursores que puede ser satisfecha aumentando la actividad de la HMG-CoA reductasa, de los receptores de LDL, o ambos (*Rao, 1986; Rao y col.,1988*). Por este motivo es razonable asumir que se podría lograr una inhibición del crecimiento de células tumorales restringiendo la disponibilidad o la síntesis de colesterol.

En los experimentos de este capítulo se estudió el efecto del simvastatin sobre la proliferación, el metabolismo lipídico y especialmente sobre la vía del mevalonato en células A549. Por último se decidió estudiar el efecto de un inhibidor no competitivo como el geraniol sobre la proliferación celular y algunos aspectos del metabolismo lipídico comparando los resultados obtenidos con los de simvastatin.

## **PRIMERA PARTE**

### **ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPIDICO EN PRESENCIA DE SIMVASTATIN: VIA DEL MEVALONATO, RELACION CON LA SINTESIS DE ACIDOS GRASOS**

#### **III.A.EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE LA PROLIFERACION Y VIABILIDAD DE CELULAS A549.**

Con el propósito de determinar la concentración de simvastatin y el tiempo de tratamiento necesarios para inhibir la proliferación celular sin afectar la viabilidad, se sembraron aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células en botellas de  $75 \text{ cm}^2$  de superficie de pegado, utilizando como medio de cultivo MEM con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Las botellas se dejaron en estufa a  $37^\circ\text{C}$  48 horas, tiempo previamente determinado para trabajar con estas células en fase logarítmica de crecimiento. Pasadas las 48 horas se tomaron 5 botellas, se les eliminó el medio, las células fueron lavadas con buffer PBS frío y removidas con solución de tripsina 0,25%. Luego se resuspendieron en MEM con 10% de SFB, se tomó una alícuota para conteo en hemocitómetro y se determinó la viabilidad por el método de exclusión de azul Tripán (ver ítem II.B.2.b.). Este lote de botellas corresponde al tiempo 0 de tratamiento y concentración de simvastatin cero. Al resto de las botellas se les cambió el medio y se reemplazó por medio fresco con o sin el agregado de distintas concentraciones de simvastatin (0-90  $\mu\text{M}$ ). Luego de este paso se volvieron a colocar en la estufa 24 ó 48 horas más. La mitad de las botellas de cada lote se procesaron a las 24 horas y el resto a las 48 horas. El procesamiento fue igual al del lote correspondiente a tiempo 0, concentración 0 de tratamiento. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla III.1.

**TABLA III.1****INDICE DE PROLIFERACION Y VIABILIDAD DE CELULAS A549: VARIACION CON EL TIEMPO DE TRATAMIENTO Y LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SIMVASTIN ENSAYADAS.**

Para calcular el índice de proliferación (IP) y la viabilidad (V) celular se utilizaron las siguientes fórmulas:

IP= N°de células a tiempo t / N°de células a tiempo cero.

V=% de células que excluyen azul Tripán

Los resultados representan la media  $\pm$  DS de 5 determinaciones independientes

Simvastatin ( $\mu$ M)	Duración del tratamiento (horas)							
	0		24		48		72	
	IP	V	IP	V	IP	V	IP	V
0	1	99	1,2	98	2,0	97	1,2	97
10	-	-	1,7	98	2,6	96	2,2	96
60	-	-	1,7	96	1,7	96	-	letal
90	-	-	1,4	96	1,5	96	-	letal

De acuerdo con los resultados se fijaron las siguientes condiciones de trabajo para estudiar el efecto del simvastatin sobre el contenido de colesterol, metabolismo lipídico y la vía del mevalonato en esta línea celular: una concentración de simvastatin de 90  $\mu$ M y un tiempo de tratamiento de 48 horas. Esta concentración inhibe la proliferación en un 25% sin afectar la viabilidad celular.



### **III.B.EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO DE CELULAS A549 EN FASE LOGARITMICA DE CRECIMIENTO.**

En todos los experimentos realizados para determinar el efecto del simvastatin sobre la composición o el metabolismo lipídico de células A549, las células fueron sometidas a un tratamiento básico similar.

Se sembraron aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de superficie de pegado, utilizando como medio de cultivo MEM con 10% de SFB. Las botellas se dejaron en estufa a 37°C durante 48 horas de manera tal de trabajar con células en fase exponencial de crecimiento. Al cabo de este tiempo se separaron las botellas en dos lotes principales: control (C) y simvastatin (S). En ambos lotes el medio de cultivo utilizado fue MEM con 10% de SFB, pero al lote (S) se le adicionó simvastatin a una concentración de 90 µM. Después de 24 horas en estufa a 37°C se descartó el medio y se reemplazó por medio IMEN Zo sin suero, adicionando al lote (S) idéntica concentración de simvastatin a la usada previamente. Las células se incubaron en este medio 24 horas a 37°C

#### **III.B.1.CONTENIDO DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS. COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS.**

Las células fueron tratadas como se describió en el ítem III.B., al cabo de las 48 horas de tratamiento se removieron con espátula de goma y se obtuvo una suspensión celular. De esta suspensión se obtuvieron alícuotas para determinar la cantidad de proteína celular total, cuantificar fósforo y extraer lípidos totales e insaponificables, empleando en cada caso la metodología descrita en "Materiales y Métodos".

Los lípidos totales extraídos se utilizaron para separar lípidos neutros de fosfolípidos y estudiar la composición de ácidos grasos de estos últimos por GLC (ver ítems II.B.1.a y II.B.1.d). El tratamiento con simvastatin de las células A549 prácticamente no provoca cambios en la composición de ácidos grasos de sus fosfolípidos. Los niveles de 20:4 n-6 tienden a estar incrementados, pero sólo los niveles de 22:6 n-3 y el índice de insaturación (II) son significativamente más

elevados en las células tratadas con simvastatin respecto a las células control. Estos resultados pueden observarse en la tabla III.2.

Los lípidos insaponificables se utilizaron para cuantificar colesterol por TLC (ver ítem II.B.1.f.). La adición de simvastatin al medio no ocasiona cambios en el contenido de colesterol celular pero si provoca un gran incremento en el contenido de fosfolípidos, como puede apreciarse en la fig. III.1.

**TABLA III.2.****DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS, RELACIONES E INDICE DE INSATURACION EN CELULAS A549 CONTROL Y TRATADAS CON SIMVASTATIN 90  $\mu$ M.**

Sólo se consideraron los ácidos grasos principales. Índice de insaturación =  $II = \Sigma \% \text{ de ácido graso} \cdot n^\circ \text{ de dobles ligaduras del ácido graso}$ .

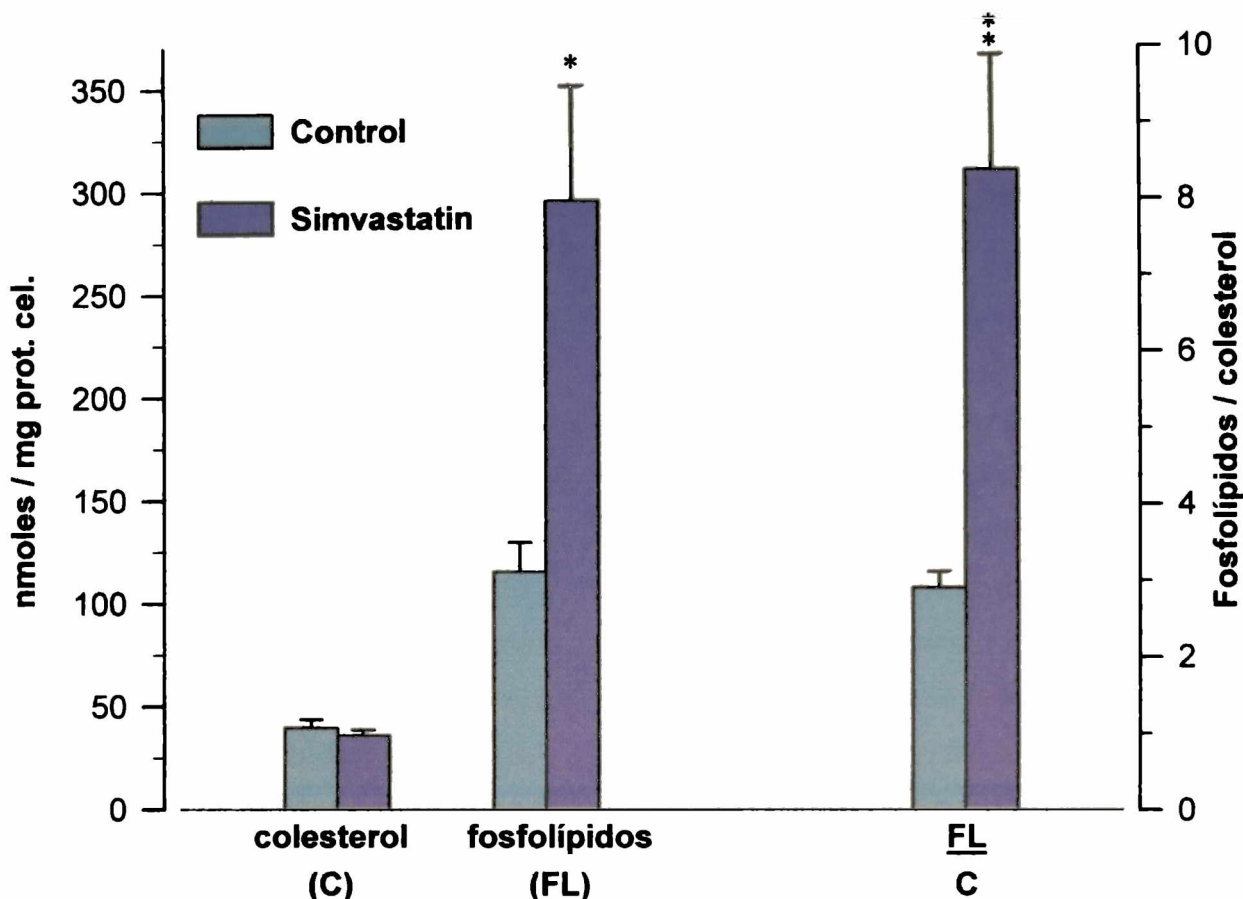
Los resultados representan la media  $\pm$  DS de 4 determinaciones independientes.

Significativamente diferente respecto al control correspondiente: (\*)  $p < 0,05$

<b>ACIDO GRASO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>SIMVASTATIN</b>
<b>14:0</b>	<b>2,5 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,7</b>
<b>16:0</b>	<b>24,5 <math>\pm</math> 2,8</b>	<b>22,8 <math>\pm</math> 0,8</b>
<b>16:1 n-7</b>	<b>9,5 <math>\pm</math> 1,9</b>	<b>9,4 <math>\pm</math> 2,9</b>
<b>18:0</b>	<b>19,1 <math>\pm</math> 2,6</b>	<b>20,7 <math>\pm</math> 6,7</b>
<b>18:1 n-9</b>	<b>25,4 <math>\pm</math> 3,0</b>	<b>19,7 <math>\pm</math> 5,4</b>
<b>18:1 n-7</b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 2,1</b>
<b>18:2 n-6</b>	<b>2,3 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>3,7 <math>\pm</math> 0,8</b>
<b>18:3 n-6</b>	<b>2,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>5,0 <math>\pm</math> 2,5</b>
<b>20:4 n-6</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 2,5</b>
<b>22:6 n-3</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>6,7 <math>\pm</math> 2,0*</b>
<b>16:0/16:1</b>	<b>2,7 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>2,7 <math>\pm</math> 1,1</b>
<b>18:0/18:1</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>1,1 <math>\pm</math> 1,0</b>
<b>18:2/20:4</b>	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 0,2</b>
<b>Sum. Saturados</b>	<b>46,2 <math>\pm</math> 4,4</b>	<b>46,6 <math>\pm</math> 5,4</b>
<b>Sum. n-6</b>	<b>9,6 <math>\pm</math> 3,6</b>	<b>14,6 <math>\pm</math> 6,6</b>
<b>Sum n-3</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>6,7 <math>\pm</math> 2,0*</b>
<b>II</b>	<b>91,5 <math>\pm</math> 15,1</b>	<b>118,3 <math>\pm</math> 3,7*</b>

FIGURA III.1.

## CONTENIDO DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN CELULAS A549



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones independientes

(\*)  $p < 0,01$  y (\*\*)  $p < 0,001$ , significativamente diferentes respecto al control.

## III.B.2. INCORPORACION DE COLESTEROL EXOGENO.

Con el objetivo de analizar si el contenido de colesterol no modificado en células A549 sometidas a tratamiento con simvastatin, se debía a un aumento de la incorporación desde el medio, se procedió a medir la incorporación de colesterol exógeno administrado en el medio de cultivo.

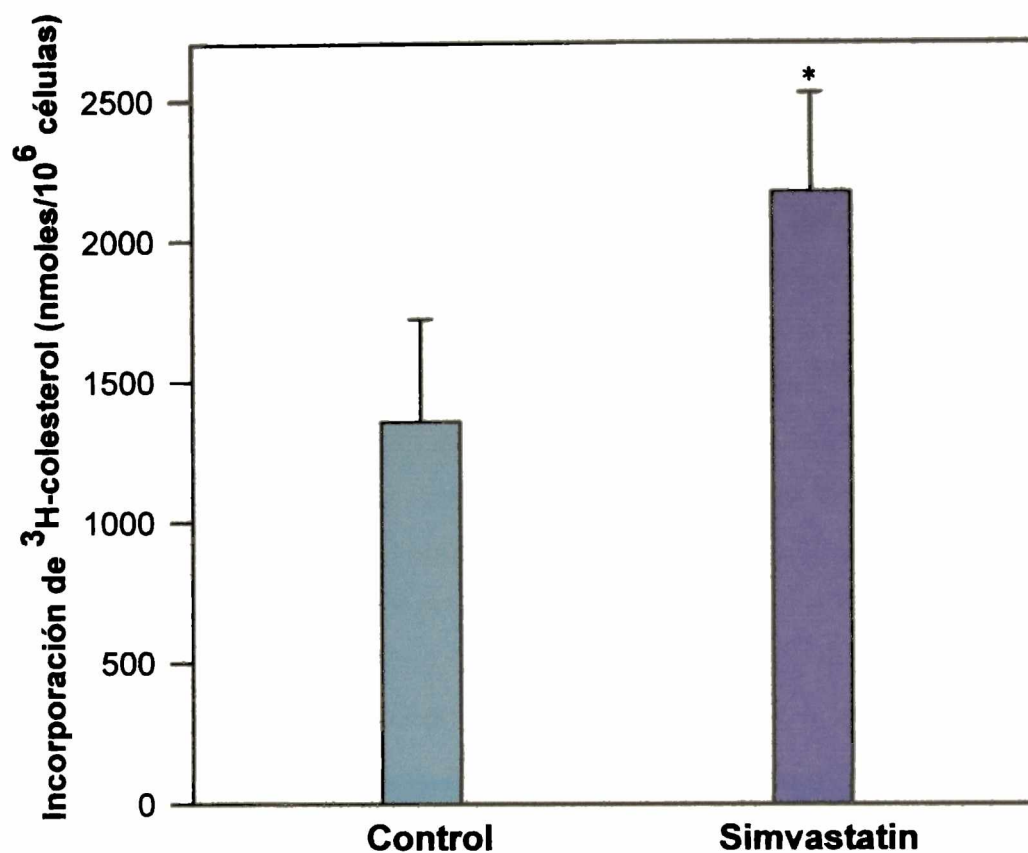
Se sembraron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células en botellas de  $25 \text{ cm}^2$  de área de pegado y se cultivaron como se describe en el ítem III.B. Una hora antes de finalizado el tratamiento se eliminó el medio de todas las botellas, salvo una del lote

(C) denominada ( $C_0$ ) y una del lote (S) denominada ( $S_0$ ), que corresponden al tiempo cero de incorporación. Al resto de las botellas se les agregó IMEN Zo más  $^3\text{H}$ -colesterol (0,2 nmoles y 10  $\mu\text{Ci}$  por botella), todas las botellas se dejaron en estufa a  $37^\circ\text{C}$  una hora. Luego de este tiempo se eliminó el medio de las botellas ( $C_0$ ) y ( $S_0$ ) y se les agregó IMEN Zo más  $^3\text{H}$ -colesterol (0,2 nmoles y 10  $\mu\text{Ci}$  por botella) como a las otras. Finalmente se eliminó el medio de todas las botellas, las células fueron lavadas 3 veces con solución fisiológica fría y removidas con solución de tripsina 0,25%. Luego se resuspendieron en MEM con 10% de SFB y se obtuvo una suspensión celular.

Después de tomar las alícuotas para conteo, la suspensión celular de cada lote se sometió a una centrifugación a baja velocidad (500 x g) obteniéndose un pellet de células sobre el cual se realizó una saponificación y extracción de lípidos insaponificables con éter de petróleo. El extracto etéreo se evaporó a seco, se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de éter de petróleo y se tomaron 100  $\mu\text{l}$  para conteo de radiactividad en contador de centelleo líquido. A las DPM obtenidas se les restó la marca encontrada en las botellas ( $C_0$ ) y ( $S_0$ ), para descontar el pegado inespecífico.

Como puede observarse en la figura III.2. se encontró un aumento significativo de la radiactividad incorporada en las células tratadas con simvastatin (2325334 DPM/millón de células), este aumento se corresponde con una captación un 60% mayor que la del lote control (125590DPM/millón de células).

**FIGURA III.2.**  
**INCORPORACION DE COLESTEROL EXOGENO**



Los datos representan la media  $\pm$  1 DS de cinco determinaciones.

Significativamente diferente respecto al control (\*)  $p < 0,05$

### **III.B.3. INCORPORACION DE <sup>14</sup>C-ACETATO EN COLESTEROL Y EN ACIDOS GRASOS CELULARES.**

Como una medida indirecta de la síntesis de colesterol y ácidos grasos se procedió a determinar la incorporación de <sup>14</sup>C-acetato en estos lípidos en células tratadas con simvastatin.

Para realizar esta medida se sembraron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células en botellas de 25 cm<sup>2</sup> de superficie de pegado y se cultivaron como se indica en el ítem III.B.. Tres horas antes de finalizado el tratamiento con simvastatin se les agregó 30  $\mu$ Ci de <sup>14</sup>C-acetato a cada botella de los respectivos lotes (C) y (S). Luego de tres

horas se eliminó el medio, las células fueron lavadas con solución fisiológica fría y removidas con espátula de goma. Se transfirieron a tubos de vidrio y se llevaron a volumen conocido con solución fisiológica para tomar una alícuota de la suspensión celular y procesarla para cuantificación de proteínas (II.B.2.c.). El resto se centrifugó a baja velocidad y se descartó el sobrenadante.

El pellet celular fue saponificado y se extrajeron lípidos insaponificables y ácidos grasos totales con éter de petróleo (ítem II.B.1.b). Una alícuota del extracto etéreo de ácidos grasos totales fue tomada para la cuantificación de radiactividad por centelleo líquido. El resto del extracto se procesó para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (II.B.1.c.) y analizarlos por radio-GLC (II.B.1.e).

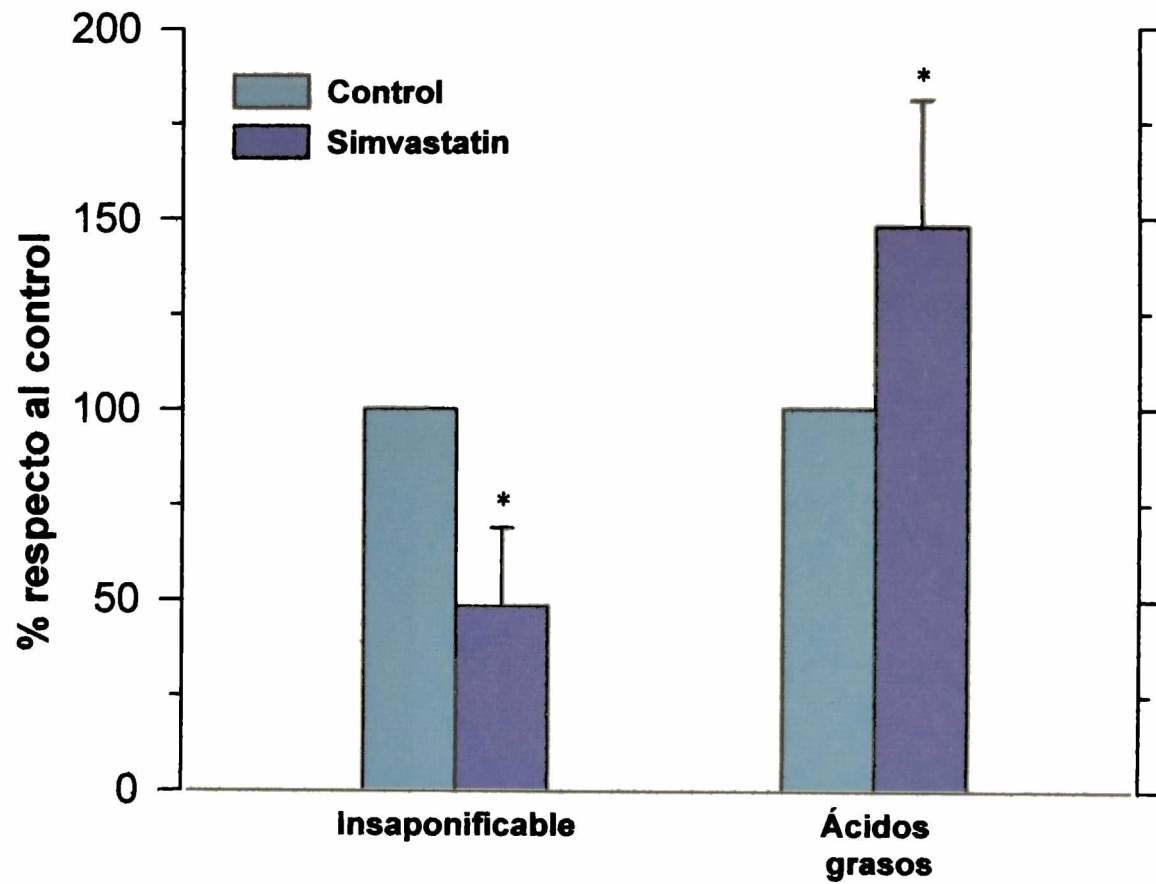
En los lípidos insaponificables también se cuantificó la radiactividad por centelleo líquido. El colesterol y sus precursores presentes en el extracto fueron separados por cromatografía en capa fina como se describe en el ítem II.B.1.h de Materiales y Métodos. Finalizada la TLC, la placa se raspó cada 0,5 centímetros, la sílica se recogió en viales conteniendo líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad presente en colesterol o alguno de sus precursores de la misma manera que en las otras fracciones lipídicas.

Los resultados correspondientes a la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato en ácidos grasos y lípidos insaponificables son los presentados en la figura III.3.

El tratamiento con simvastatin ocasiona un descenso del 48% en la cantidad de radiactividad encontrada en lípidos insaponificables. Con respecto a su distribución, estudiada por TLC, en el lote control se encuentra marca en colesterol y precursores (lanosterol y escualeno), en cambio en el lote simvastatin la única zona de la placa donde se encuentra un pico de radiactividad es en la correspondiente a colesterol. Estos datos se muestran en la figura III.4.

La distribución de esta marca en los distintos ácidos grasos puede observarse en la figura III.5, donde se aprecia un aumento en la incorporación en tres de los cuatro ácidos grasos resueltos y una tendencia, aunque no es significativa, en el 18:0. Este aumento coincide con el aumento en la incorporación total.

FIGURA III.3.

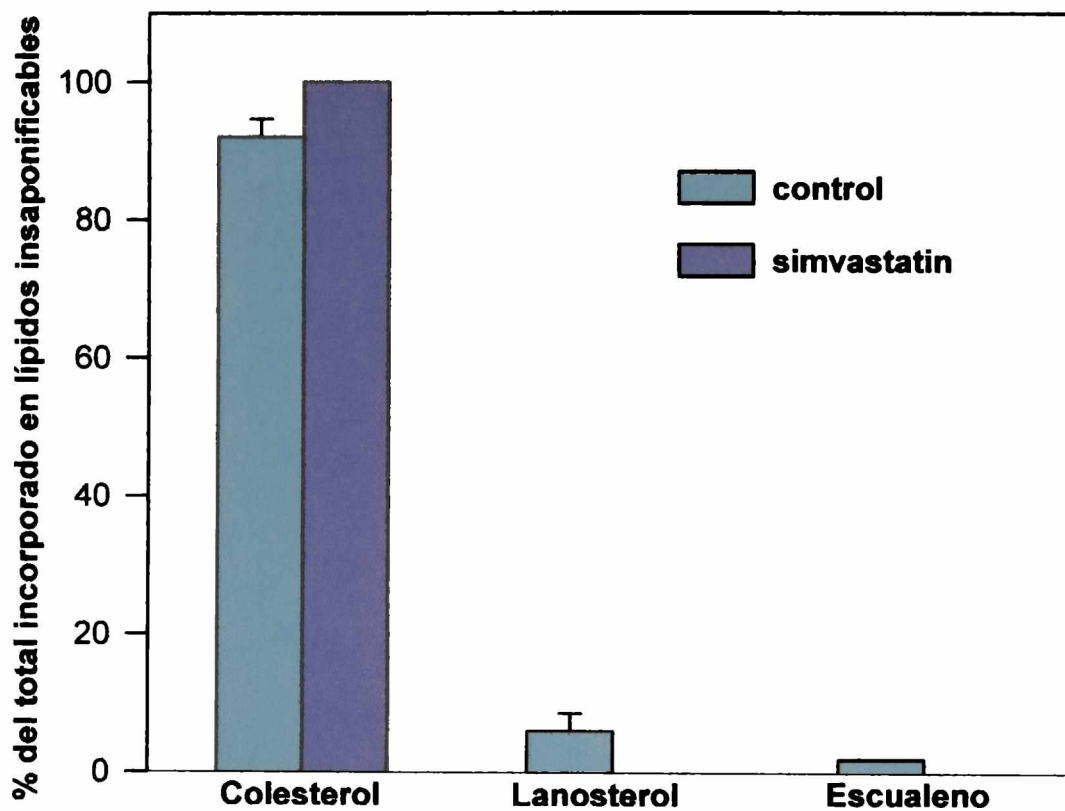
INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$ -ACETATO EN LIPIDOS CELULARES

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones.

Significativamente diferente respecto al control (\*)  $p < 0,05$



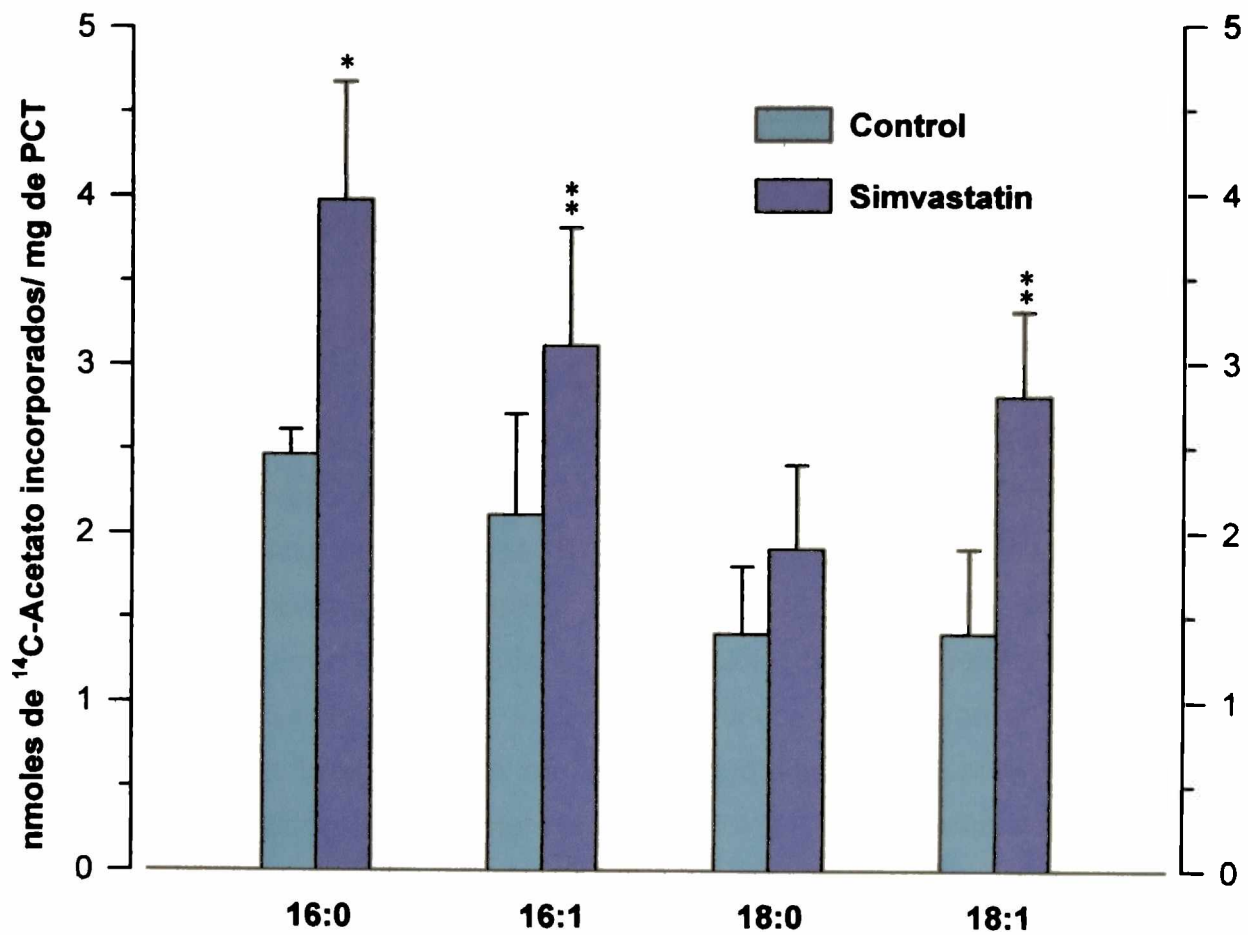
**FIGURA III.4.**  
**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA**  
**EN LIPIDOS INSAPONIFICABLES**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de tres determinaciones

FIGURA III.5.

## DISTRIBUCION DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA EN ACIDOS GRASOS TOTALES



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,01$ , significativamente diferentes respecto al control

### **III.C. ESTUDIO DE LA VIA DEL MEVALONATO EN CELULAS A549 SOMETIDAS A TRATAMIENTO CON SIMVASTATIN.**

En los experimentos anteriores se estudió el efecto del simvastatin sobre distintos parámetros lipídicos de las células A549. Con el objetivo de estudiar el efecto de este inhibidor sobre la vía del mevalonato, en pasos posteriores al catalizado por la HMG-CoA reductasa se procedió a analizar la incorporación de <sup>3</sup>H-mevalonato exógeno y su incorporación en lípidos y proteínas celulares.

Con este propósito se sembraron aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de superficie de pegado y se procesaron como se describe en el ítem III.B.. En el momento de agregar el IMEN Zo sin suero, con o sin simvastatin, también se agregó <sup>3</sup>H-mevalonolactona (10 µCi, 0,4 mmoles) a cada botella.

Luego de 24 horas de incubación con <sup>3</sup>H-mevalonolactona se eliminó el medio, las células fueron lavadas con solución fisiológica fría y removidas con espátula de goma. Se transfirieron a tubos de vidrio y se llevaron a volumen conocido con solución fisiológica para tomar una alícuota de la suspensión celular y procesarla para cuantificación de proteínas (ver ítem II.B.2.c). Otra alícuota de esta suspensión se centrifugó a baja velocidad (500 x g), se obtuvo un pellet celular y se extrajeron lípidos totales por el método de Folch (ver ítem II.B.1.a.).

El resto de la suspensión celular se centrifugó tres veces a 500 x g, lavando el pellet celular con solución fisiológica fría entre cada centrifugación. Luego se procesó el pellet como se describe en el ítem correspondiente de Materiales y Métodos para obtener las proteínas celulares delipidizadas, la fracción acuosa y la fracción lipídica correspondientes, determinándose la radiactividad incorporada en cada fracción por centelleo líquido. La suma de la radiactividad encontrada en estas tres fracciones es una medida de la radiactividad total incorporada. Los resultados pueden observarse en las figuras III.6. y III.7.

A los lípidos totales extraídos por el método de Folch se los sometió a una saponificación alcalina y se extrajeron lípidos insaponificables y ácidos grasos totales con éter de petróleo (ver Materiales y Métodos). Una alícuota del extracto

etéreo de ácidos grasos totales fue tomada para la cuantificación de radiactividad por centelleo líquido (figura III.8.).

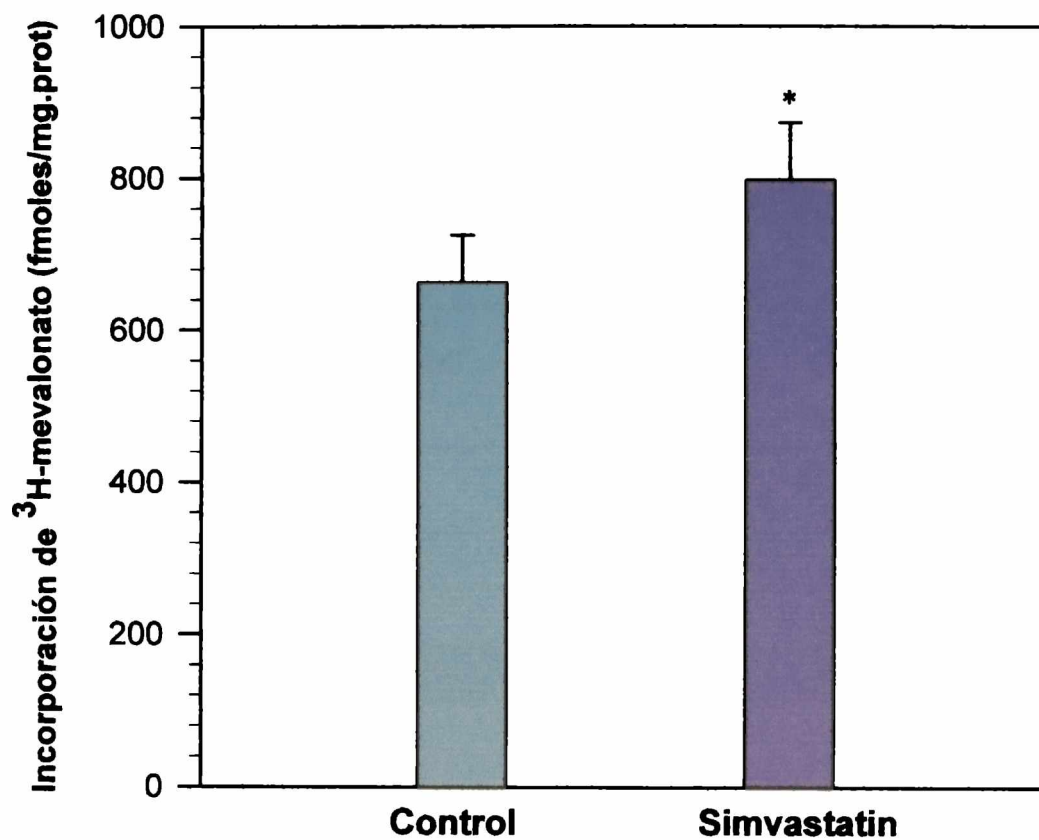
En los lípidos insaponificables también se cuantificó la radiactividad por centelleo líquido (figura III.8.). El colesterol y sus precursores presentes en el extracto fueron separados por cromatografía en capa fina como se describe en el ítem II.B.1.h. de Materiales y Métodos. Finalizada la TLC, la placa se raspó cada 0,5 centímetros, la sílica se recogió en viales conteniendo líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad presente en colesterol o alguno de sus precursores de la misma manera que en las otras fracciones celulares, ver resultados en figuras III.9. y III.10.

Como puede apreciarse en la figura III.6. el simvastatin provoca un aumento significativo de la incorporación total de  $^3\text{H}$ -mevalonolactona exógena (7%), este aumento se debe a un incremento considerable en la incorporación en la fracción proteica más que en las otras fracciones celulares (figura III.7.).

Cuando se estudia la incorporación en lípidos celulares (figura III.8.) puede observarse que, si bien el simvastatin no ocasiona diferencias en la incorporación total, existe una diferencia significativa en la distribución de la marca en los distintos lípidos celulares. Se observa un aumento en la radiactividad encontrada en ácidos grasos (78%) y una disminución equivalente en lípidos insaponificables en las células tratadas, lo que estaría indicando que el simvastatin podría inhibir otra enzima de la vía del mevalonato además de la HMG-CoA reductasa.

Al analizar la incorporación absoluta de la radiactividad en lípidos insaponificables (figura III.9.), se observa una diferencia significativa sólo en colesterol y en dolicol. Con respecto a la distribución porcentual de la marca en los distintos lípidos insaponificables, como puede verse en la figura III.10., la mayor incorporación se encuentra en colesterol. Aunque en las células tratadas existe una cantidad de marca importante en sus precursores así como también en dolicol, especie que no se encuentra marcada en las células controles.

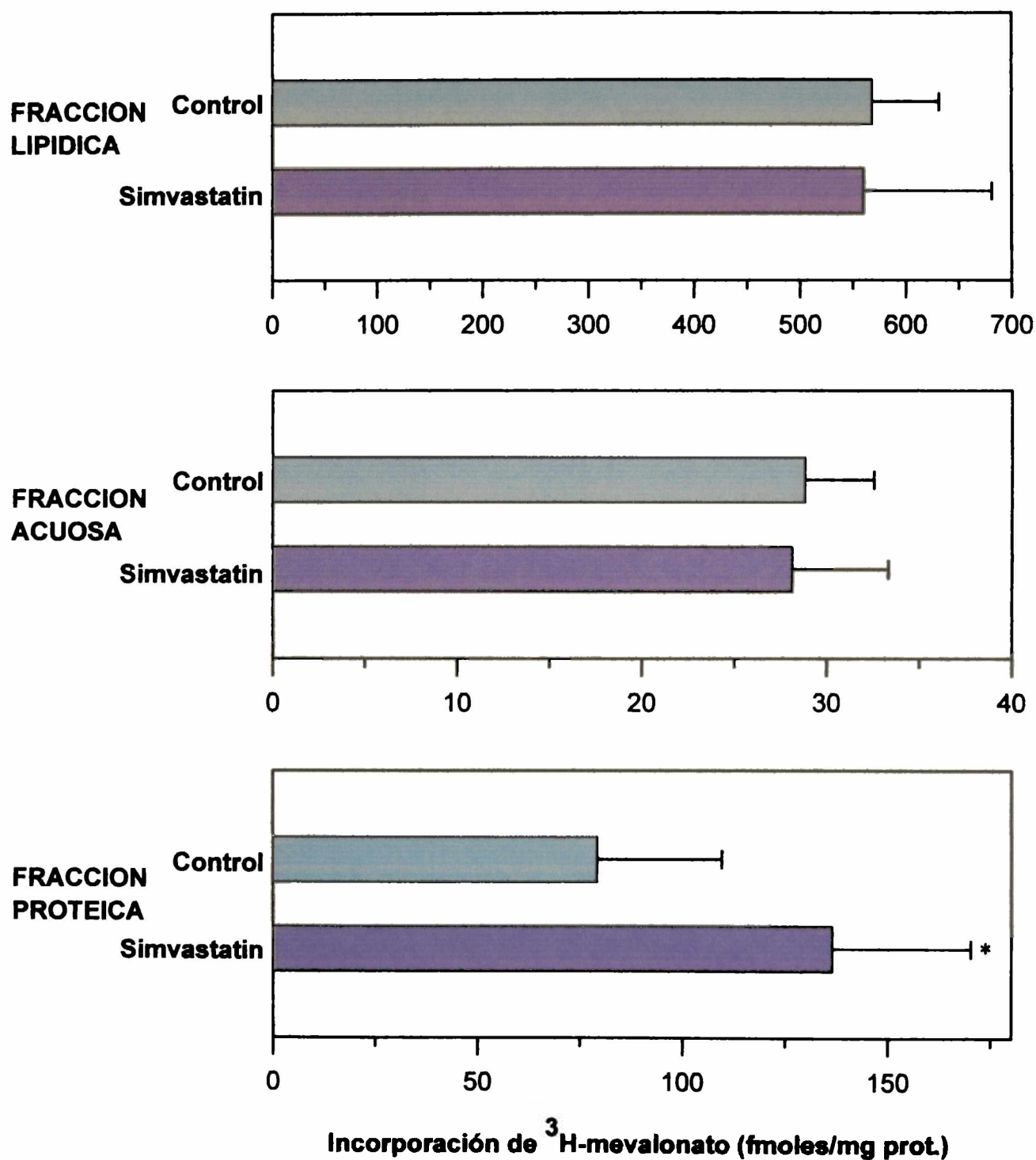
FIGURA III.6.

INCORPORACION TOTAL DE <sup>3</sup>H-MEVALONATO EXOGENO

Los datos representan la media  $\pm$  DS de seis determinaciones

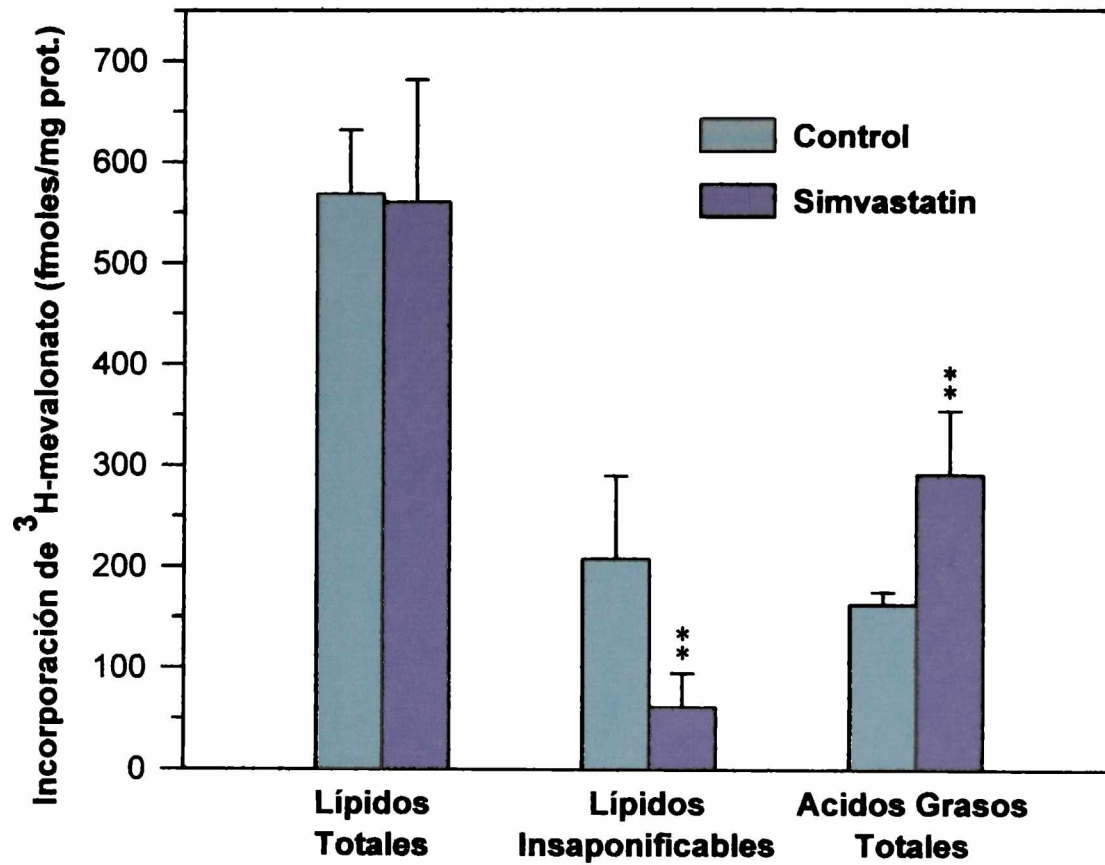
(\*)  $p < 0,05$

FIGURA III.7.

**EFFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE LA INCORPORACION DE MEVALONATO EN FRACCIONES CELULARES**

Incorporación de <sup>3</sup>H-mevalonato (fmoles/mg prot.)  
Los datos representan la media ± DS de seis determinaciones  
(\*) p < 0,05

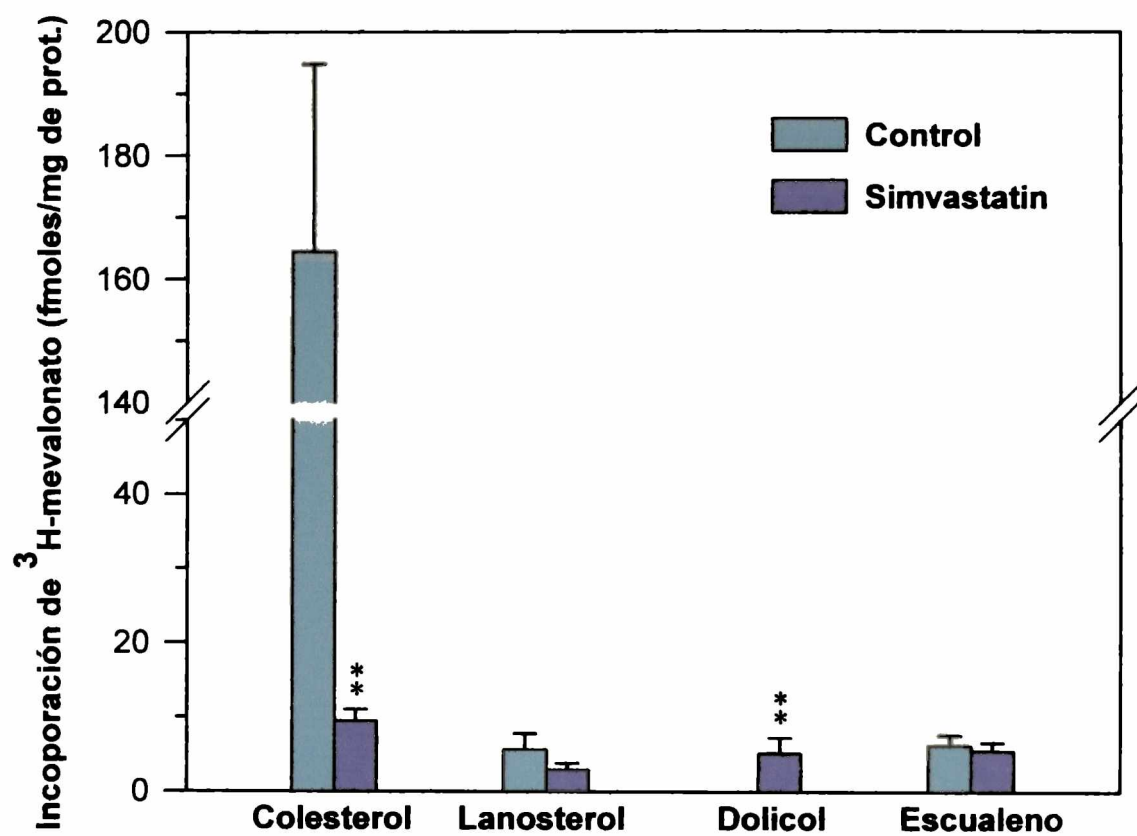
FIGURA III.8.

INCORPORACION DE <sup>3</sup>H-MEVALONATO EN LIPIDOS CELULARES

Los datos representan la media  $\pm$  DS de seis determinaciones

(\*\*)  $p < 0,01$

FIGURA III.9.

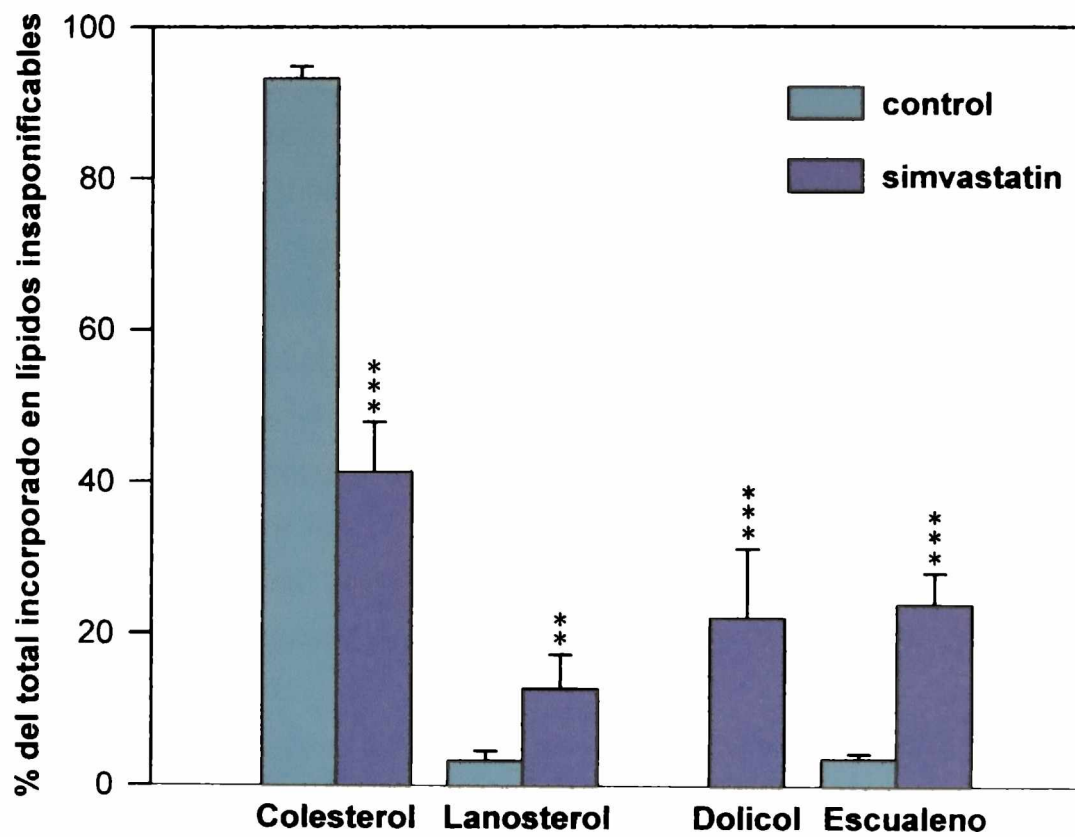
INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -MEVALONATO EN LIPIDOS INSAPONIFICABLES

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*\*)  $p < 0,001$



**FIGURA III.10.**  
**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA RADIOACTIVIDAD INCORPORADA**  
**EN LIPIDOS INSAPONIFICABLES**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*\*)  $p < 0,001$  y (\*\*\*)  $p < 0,0001$

### **III.D.EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE LA CAPTACION Y METABOLIZACION DE ACIDOS GRASOS EXOGENOS EN CELULAS A549.**

Con el propósito de estudiar el efecto del simvastatin sobre la capacidad de las células A549 de incorporar y metabolizar ácidos grasos radiactivos desde el medio, se sembraron  $2,5 \times 10^6$  células en botellas de  $75 \text{ cm}^2$  de superficie de pegado y se procesaron como se indica en el ítem III.B. 24 horas antes de cosechar las células se cambia el medio por IMEN Zo suplementado con 10 nmoles de los siguientes sustratos radiactivos :  $[1-^{14}\text{C}]$  ácido palmítico,  $[1-^{14}\text{C}]$  ácido  $\alpha$ -linolénico y  $[1-^{14}\text{C}]$  ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (ver ítem II.B.2.d.3.).

Finalizadas las 24 horas de incubación, las células fueron removidas con espátula de goma y buffer PBS frío obteniéndose una suspensión celular. Se tomó una alícuota para determinación de proteínas y el resto se sometió a saponificación alcalina. Se extrajeron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos totales, en estos últimos se determinó radiactividad por centelleo líquido y se obtuvieron los ésteres metílicos para analizar la distribución de la radiactividad por radio-GLC (ver II.B.1.c. y II.B.1.e.).

Bajo las condiciones de cultivo todos los ácidos grasos ensayados (16:0, 18:3 n-3 y 20:3 n-6) fueron igualmente incorporados por las células control, mientras que las células tratadas con simvastatin mostraron una mayor incorporación de los ácidos 18:3 n-3 y 20:3 n-6 (figura III.11.).

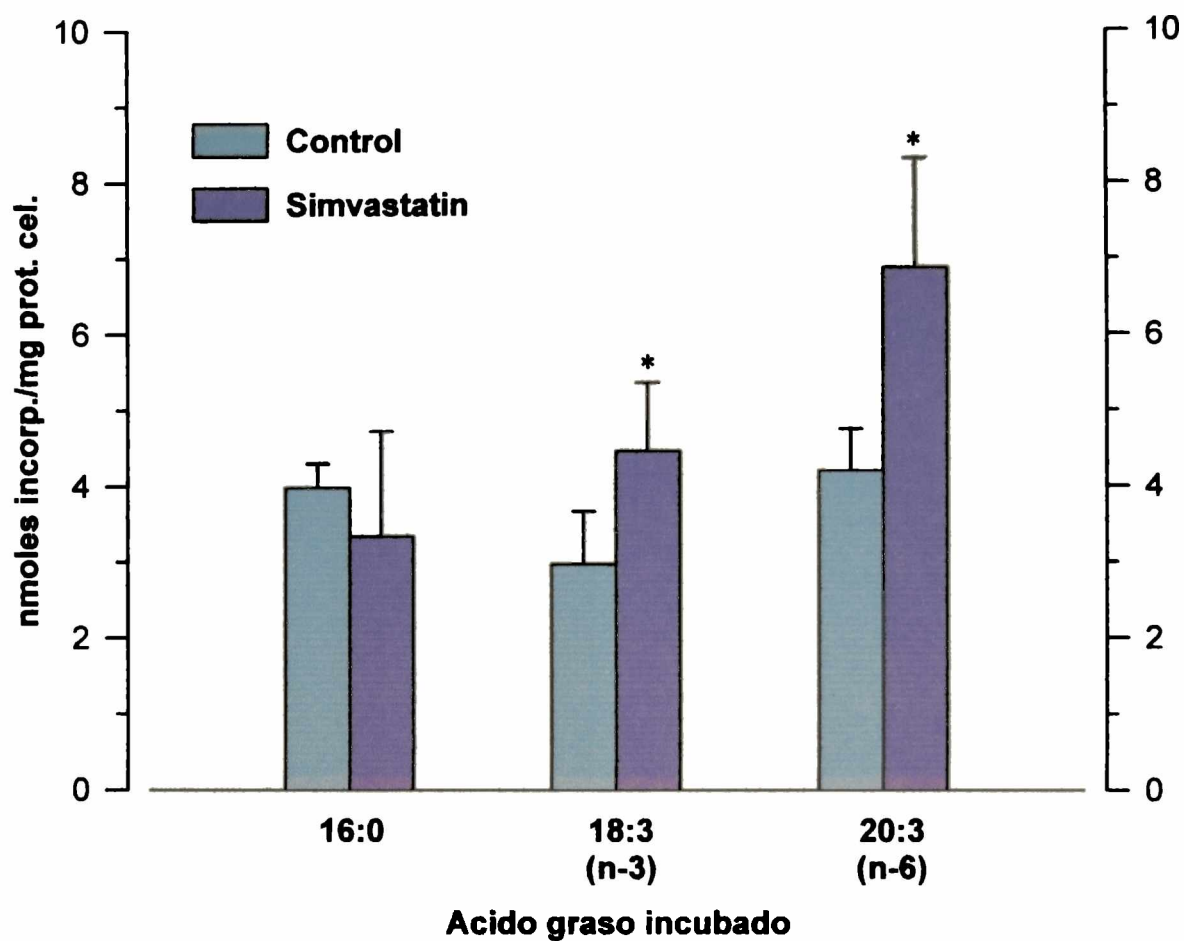
El ácido palmítico (figura III.12.) fue desaturado en la posición  $\Delta 9$  para dar ácido palmitoleico (16:1) y elongado a 18:0. La síntesis de 18:1 pudo realizarse tanto por elongación del 16:1 como por desaturación del 18:0. Las células tratadas con simvastatin muestran un aumento en la metabolización del 16:0, este aumento podría deberse a un aumento en la actividad  $\Delta 9$  desaturasa y/o en la actividad de las enzimas del complejo elongante 16:0/18:0.

La figura III.13 muestra que las células A549 pueden convertir activamente el ácido eicosatrienoico (n-6) en araquidonato, demostrando que esta línea celular humana tiene una  $\Delta 5$  desaturasa muy activa, cuya actividad se encuentra altamente incrementada por el simvastatin (% de conversión 58,1 vs. 75,7).

Cuando las células fueron incubadas con 18:3 n-3, sus productos de elongación y desaturación se formaron junto con los productos provenientes de la síntesis *de novo* 16:0, 16:1, 18:0 y 18:1 (figura III.14). Este sistema de cultivo celular convierte el precursor radiactivo en ácido eicosapentaenoico (51%), esta especie fue también elongada y desaturada a ácido docosahexaenoico (22:6 n-3) (figura III.14). Este hecho demuestra que las células A549 también poseen una activa  $\Delta 6$  desaturasa (ver figura III.14)

Las células tratadas con simvastatin mostraron un incremento en la relación 20:5/20:4 y una disminución en la relación 20:4/18:4 (tabla III.3), como consecuencia de un aumento en la actividad  $\Delta 5$  desaturasa y una probable inhibición de las reacciones de elongación y desaturación, sin diferencias aparentes en la actividad  $\Delta 6$  desaturasa.

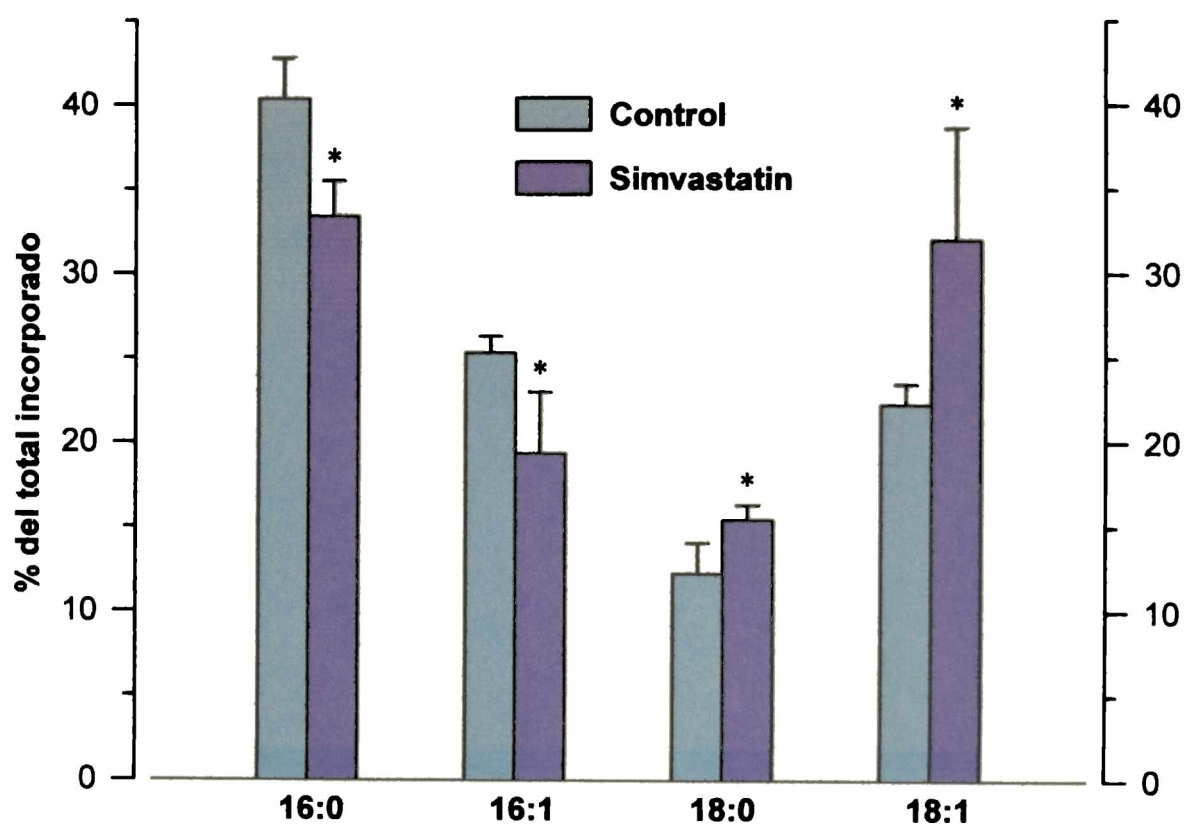
FIGURA III.11.

INCORPORACION DE [1-<sup>14</sup>C] ACIDOS GRASOS EXOGENOS EN CELULAS A549

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$ .

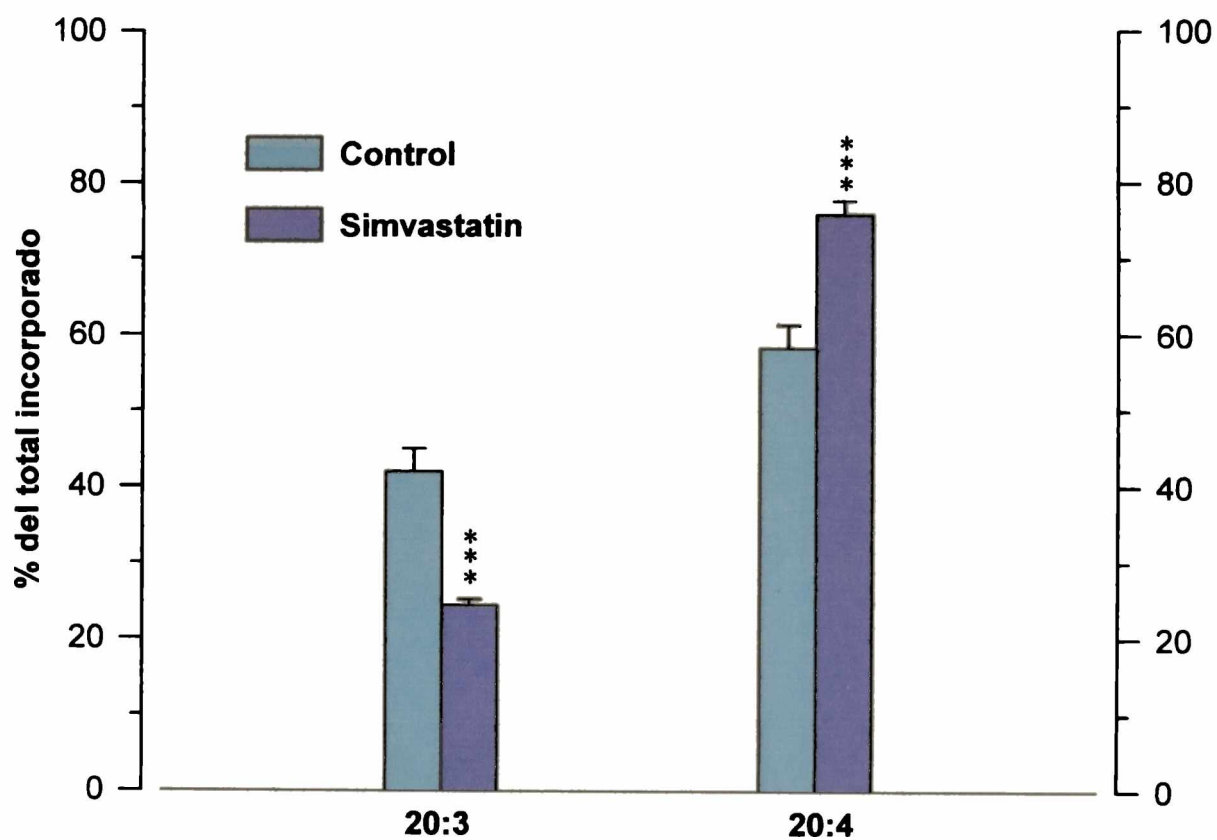
**FIGURA III.12.**  
**DISTRIBUCION DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA EN LOS PRODUCTOS DE METABOLIZACION DEL [1-<sup>14</sup>C] ACIDO PALMITICO EN CELULAS A549**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$

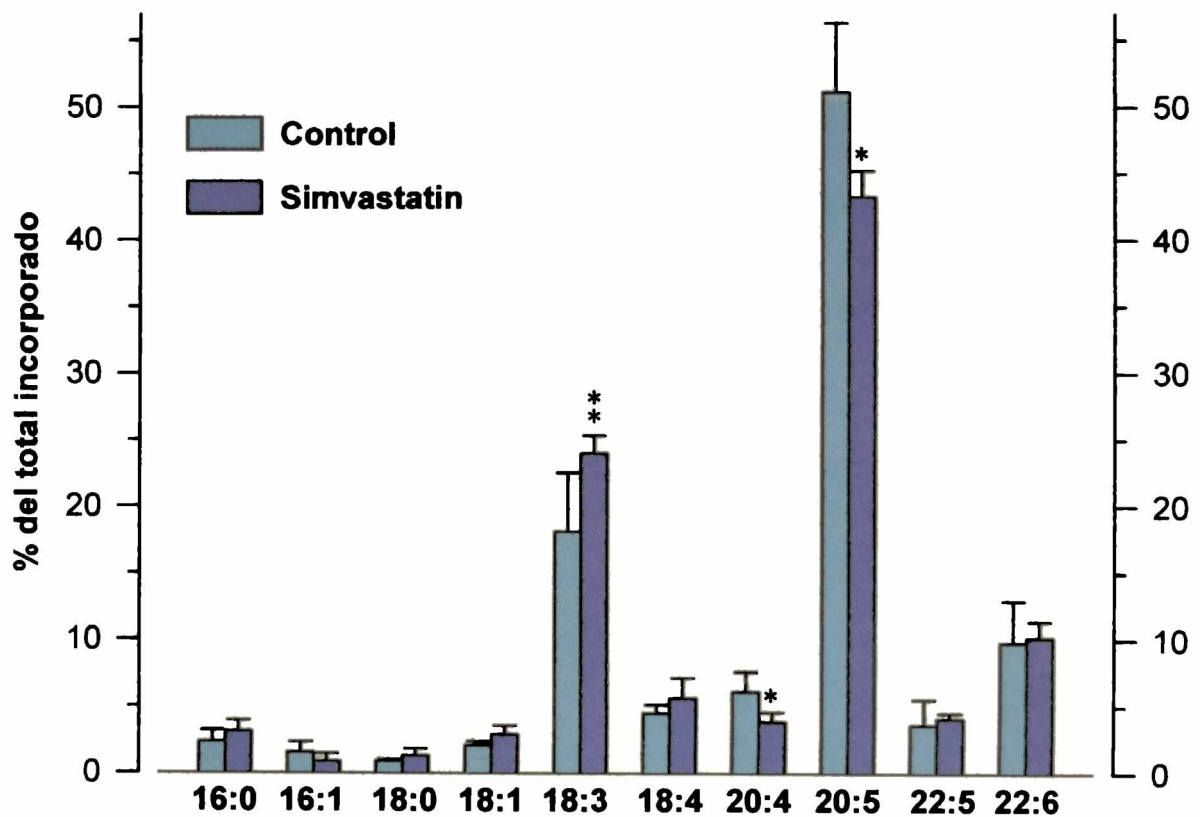
**FIGURA III.13.**  
**DISTRIBUCION DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA EN LOS PRODUCTOS DE METABOLIZACION DEL [1-<sup>14</sup>C] ACIDO DIHOMO- $\gamma$ -LINOLENICO EN CELULAS A549**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*\*\*)  $p < 0,0001$

**FIGURA III.14.**  
**DISTRIBUCION DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA EN LOS PRODUCTOS DE METABOLIZACION DEL [1-<sup>14</sup>C] ACIDO  $\alpha$ -LINOLENICO EN CELULAS A549**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$  y (\*\*)  $p < 0,02$ .

**TABLA III.3.**  
**RELACION ENTRE LOS DISTINTOS ACIDOS GRASOS PROVENIENTES**  
**DE LA METABOLIZACION DEL ACIDO [1-<sup>14</sup>C]  $\alpha$ -LINOLENICO, PREVIAMENTE**  
**INCORPORADO EN CELULAS A549**

	<b>20:5/18:3</b>	<b>20:5/ 20:4</b>	<b>18:4/ 18:3</b>	<b>20:4/ 18:4</b>	<b>20:4/ 18:3</b>
<b>CONTROL</b>	2,19 $\pm$ 0,66	6,70 $\pm$ 1,06	0,22 $\pm$ 0,02	1,50 $\pm$ 0,43	0,33 $\pm$ 0,05
<b>SIMVAS-TATIN</b>	1,81 $\pm$ 0,16	11,51 $\pm$ 2,06**	0,24 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,23*	0,16 $\pm$ 0,02***

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*) p < 0,05, (\*\*) p < 0,01 y (\*\*\*) p < 0,001



**SEGUNDA PARTE****ESTUDIO DEL METABOLISMO LIPIDICO EN PRESENCIA DE GERANIOL:****III.E.EFECTO DEL GERANIOL SOBRE LA PROLIFERACION Y VIABILIDAD DE CELULAS A549.**

En este experimento se procedió como en III.A utilizándose geraniol en lugar de simvastatin, las concentraciones de geraniol usadas fueron de 0 a 1200  $\mu$ M. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla III.4.

**TABLA III.4.****INDICE DE PROLIFERACION Y VIABILIDAD DE CELULAS A549: VARIACION CON EL TIEMPO DE TRATAMIENTO Y LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GERANIOL ENSAYADAS.**

Los resultados representan la media  $\pm$  DS de 4 determinaciones independientes

Geraniol ( $\mu$ M)	Duración del tratamiento (horas)					
	0		24		48	
	IP	V	IP	V	IP	V
0	1	99	1,5	98	2,4	97
400	-	-	1,3	98	1,9	96
600	-	-	1,2	99	1,3	96
900	-	-	1,1	99	1,0	92
1200	-	-	1,1	99	-	letal

De acuerdo con los resultados se fijaron las siguientes condiciones de trabajo para estudiar el efecto del geraniol sobre el contenido de colesterol y metabolismo lipídico en esta línea celular: una concentración de geraniol 600  $\mu\text{M}$  y un tiempo de tratamiento de 48 horas. Esta concentración inhibe la proliferación en un 47% sin afectar la viabilidad celular. Las concentraciones mayores resultan letales para las células.

### **III.F.EFECTO DEL GERANIOL SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO DE CELULAS A549 EN FASE LOGARITMICA DE CRECIMIENTO.**

El tratamiento básico al cual se sometieron las células fue el mismo que el descrito en el ítem III.B., reemplazando al simvastatin con geraniol a una concentración 600  $\mu\text{M}$ .

#### **III.F.1.CONTENIDO DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS. COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS.**

El procesamiento de las células fue el mismo que se describe en III.B.1. El tratamiento con geraniol ocasiona una disminución en el contenido de 16:1 n-7 y del 18:1 n-9, lo que estaría indicando una disminución de la actividad de la  $\Delta 9$  desaturasa, esto se refleja en un aumento en las células tratadas de la relación 16:0/16:1 y 18:0/18:1. Además, se observa un aumento del 18:2 n-6 y la consecuente disminución en el contenido de 18:3 n-6, esto indicaría una disminución de la actividad  $\Delta 6$  desaturasa coincidente con el aumento en la relación 18:2/20:4. Estos resultados se muestran en la tabla III.5. El tratamiento causa una disminución en el contenido de colesterol celular así como en el de fósforo (figura III.15.). Sin embargo, la relación FL/Col está aumentada debido a una mayor disminución del contenido de colesterol que de fosfolípidos.

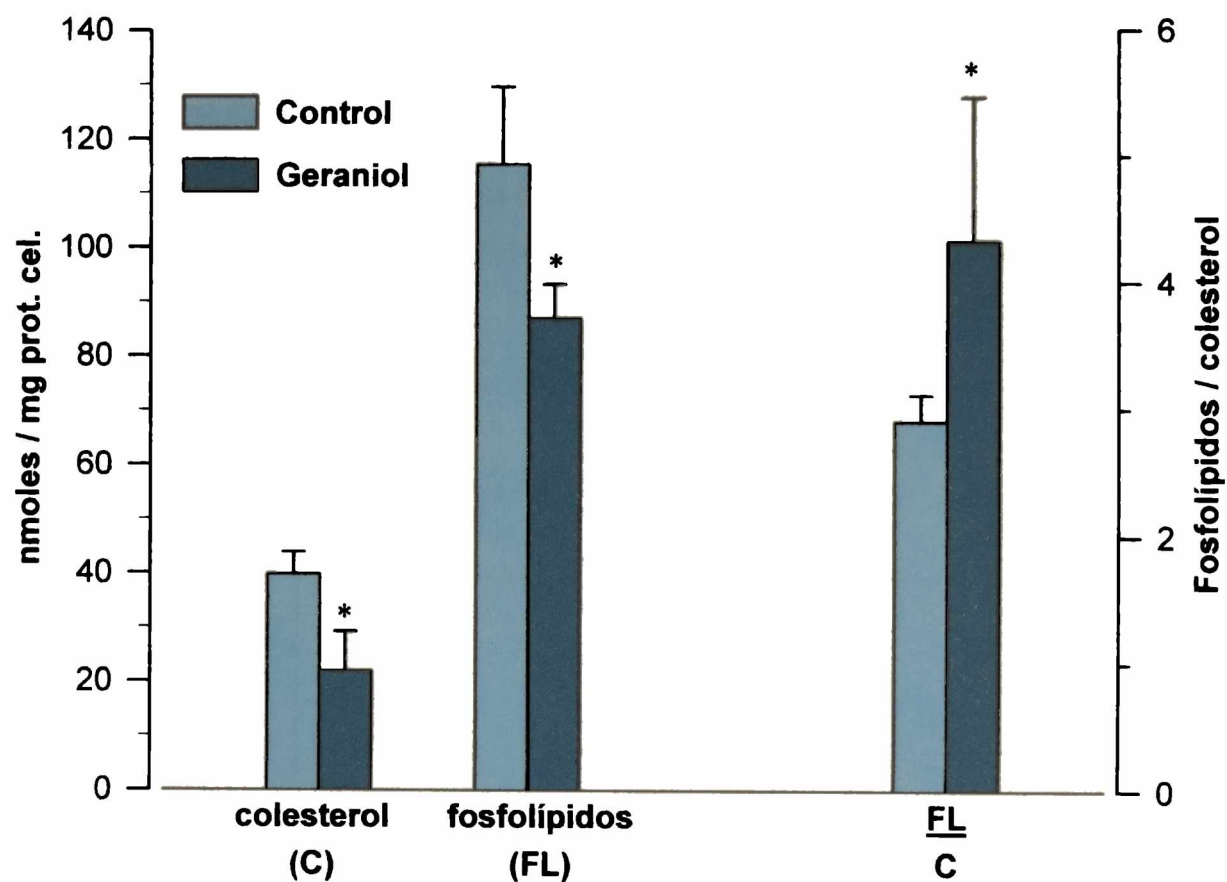
**TABLA III.2.****DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS, RELACIONES E INDICE DE INSATURACION EN CELULAS A549 CONTROL Y TRATADAS CON GERANIOL 600  $\mu$ M.**

Sólo se consideraron los ácidos grasos principales. Índice de insaturación =  $II = \sum \% \text{ de ácido graso} \cdot n^{\circ} \text{ de dobles ligaduras del ácido graso}$ . Los resultados representan la media  $\pm$  DS de 4 determinaciones independientes. Significativamente diferente respecto al control correspondiente: (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$

<b>ACIDO GRASO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>GERANIOL</b>
<b>14:0</b>	<b>2,5 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>3,2 <math>\pm</math> 0,3</b>
<b>16:0</b>	<b>24,5 <math>\pm</math> 2,8</b>	<b>23,4 <math>\pm</math> 0,6</b>
<b>16:1 n-7</b>	<b>9,5 <math>\pm</math> 1,9</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,7*</b>
<b>18:0</b>	<b>19,1 <math>\pm</math> 2,6</b>	<b>22,1 <math>\pm</math> 0,1</b>
<b>18:1 n-9</b>	<b>25,4 <math>\pm</math> 3,0</b>	<b>19,3 <math>\pm</math> 0,5*</b>
<b>18:1 n-7</b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 0,3</b>
<b>18:2 n-6</b>	<b>2,3 <math>\pm</math> 1,3</b>	<b>7,3 <math>\pm</math> 0,5**</b>
<b>18:3 n-6</b>	<b>2,0 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>0,8 <math>\pm</math> 0,0*</b>
<b>20:4 n-6</b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>7,5 <math>\pm</math> 0,6</b>
<b>22:6 n-3</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 0,2</b>
<b>16:0/16:1</b>	<b>2,7 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>4,5 <math>\pm</math> 0,6**</b>
<b>18:0/18:1</b>	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,0*</b>
<b>18:2/20:4</b>	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>1,0 <math>\pm</math> 0,0*</b>
<b>Sum. Saturados</b>	<b>46,2 <math>\pm</math> 4,4</b>	<b>48,7 <math>\pm</math> 1,0</b>
<b>Sum. n-6</b>	<b>9,6 <math>\pm</math> 3,6</b>	<b>15,5 <math>\pm</math> 1,0*</b>
<b>Sum n-3</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>1,2 <math>\pm</math> 0,2</b>
<b>IU</b>	<b>91,5 <math>\pm</math> 15,1</b>	<b>90,4 <math>\pm</math> 3,0</b>

FIGURA III.15.

## CONTENIDO DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN CELULAS A549



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones independientes

(\*)  $p < 0,05$ , significativamente diferentes respecto al control

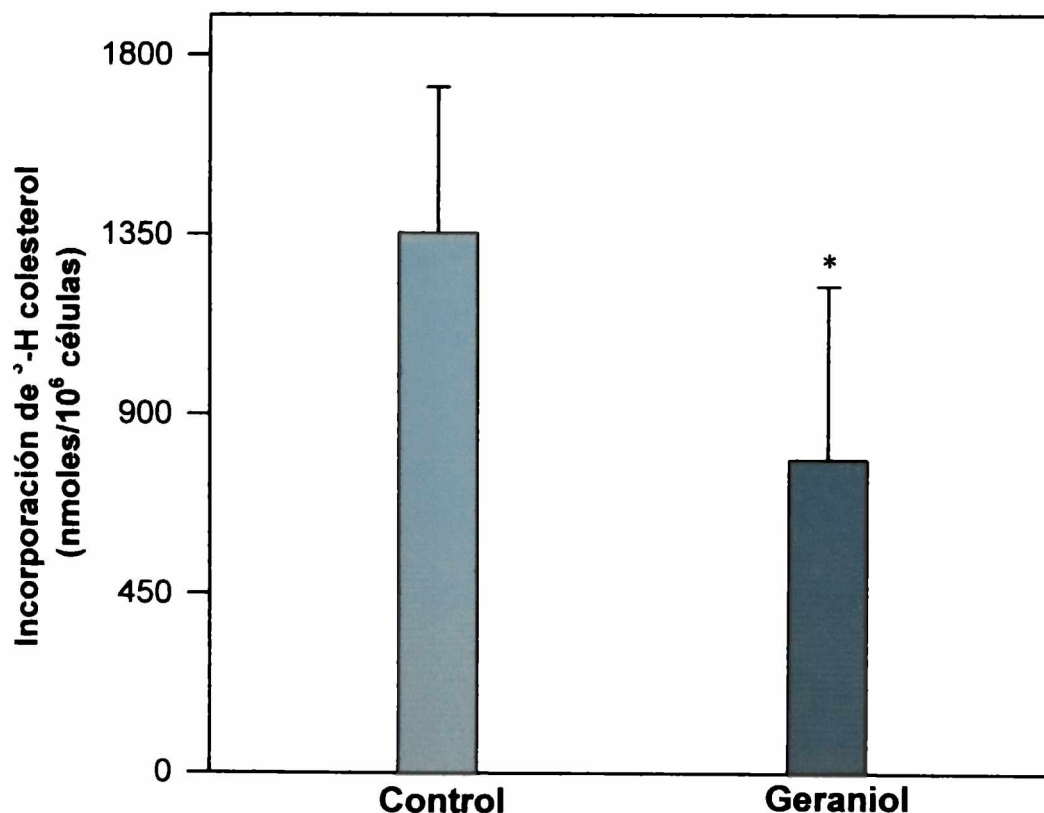
### III.F.2. INCORPORACION DE COLESTEROL EXOGENO

El contenido de colesterol disminuido en las células tratadas con geraniol podría deberse solamente a la inhibición de la HMG-CoA reductasa o se podría sumar a esto una disminución en la captación. Con el propósito de analizar estos aspectos se midió la incorporación de colesterol exógeno como se describe en la primera parte de este capítulo.

Los resultados mostrados en la figura III.16. indican que hay una disminución del 42% en la captación de colesterol exógeno en las células tratadas con respecto a las controles.

FIGURA III.16.

#### INCORPORACION DE COLESTEROL EXOGENO



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$

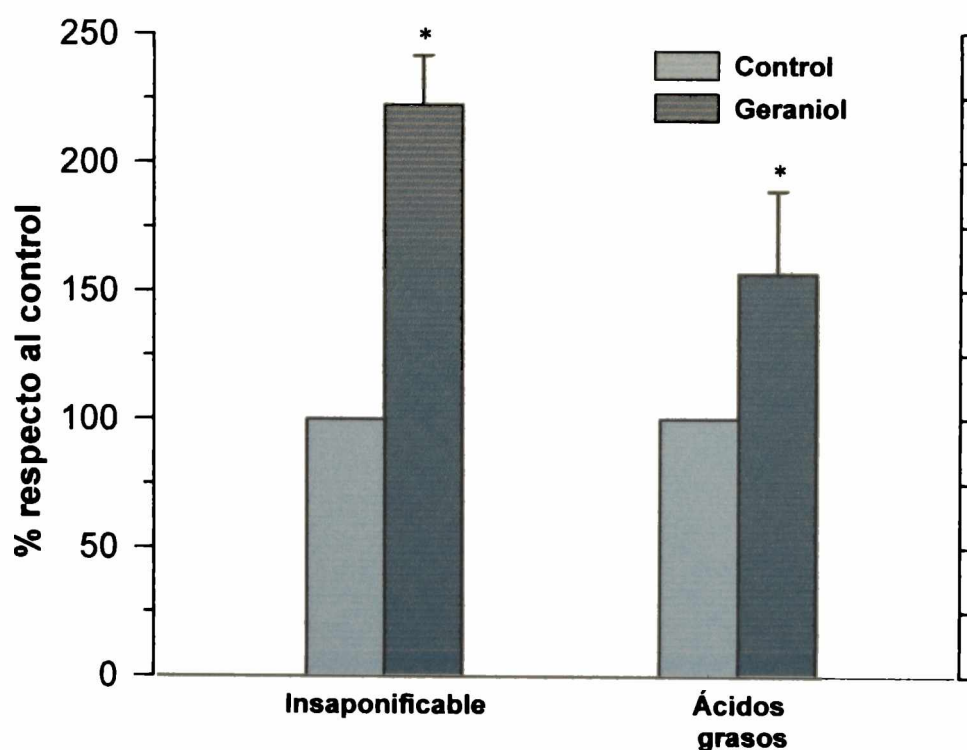
### III.F.3. INCORPORACION DE $^{14}\text{C}$ -ACETATO EN COLESTEROL Y EN ACIDOS GRASOS CELULARES.

Con el objetivo de realizar una medida indirecta de la síntesis de lípidos insaponificables y ácidos grasos se determinó la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato exógeno como se describe en el ítem III.B.3. En la figura III.17. puede observarse un aumento de la incorporación de acetato tanto en lípidos insaponificables (122%) como en ácidos grasos (57%) con respecto al control.

Cuando se estudiaron las especies del insaponificable se encontró marca en colesterol y precursores, tanto en el lote control como geraniol, datos que pueden observarse en la figura III.18.

FIGURA III.17.

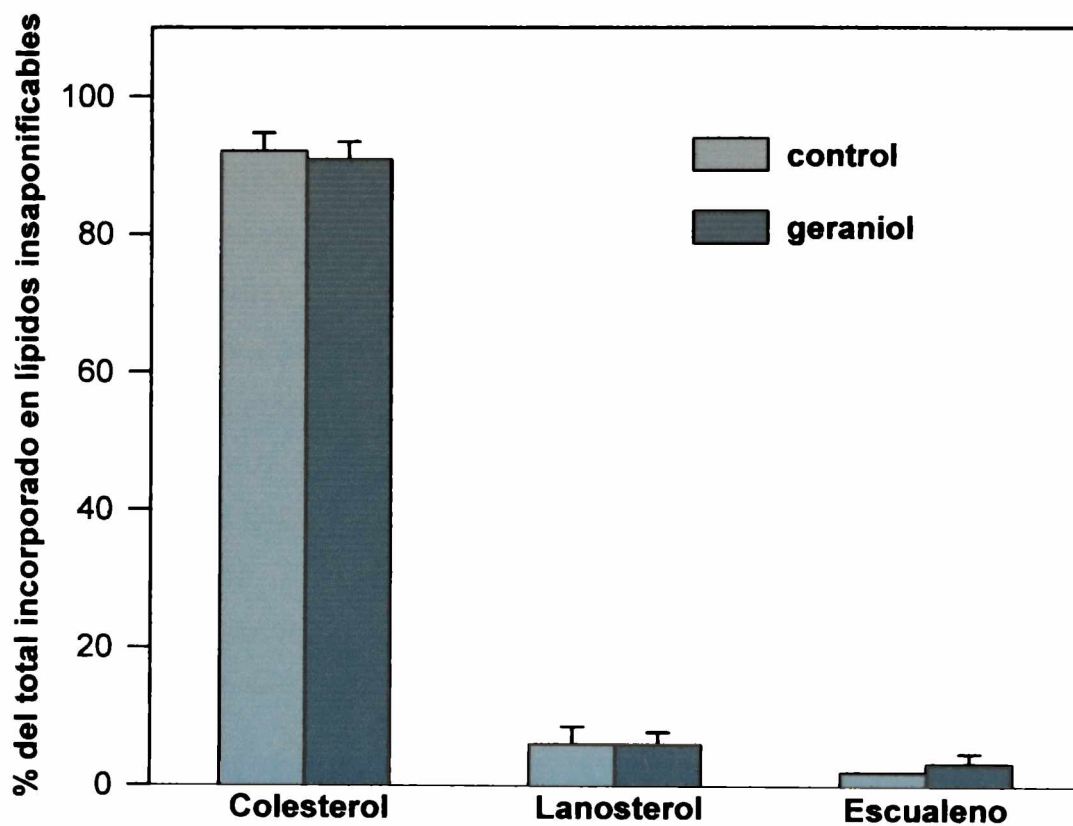
#### INCORPORACION DE $^{14}\text{C}$ -ACETATO EN LIPIDOS CELULARES



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

Significativamente diferente respecto al control (\*)  $p < 0,01$ .

**FIGURA III.18.**  
**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA**  
**EN LIPIDOS INSAPONIFICABLES**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones.

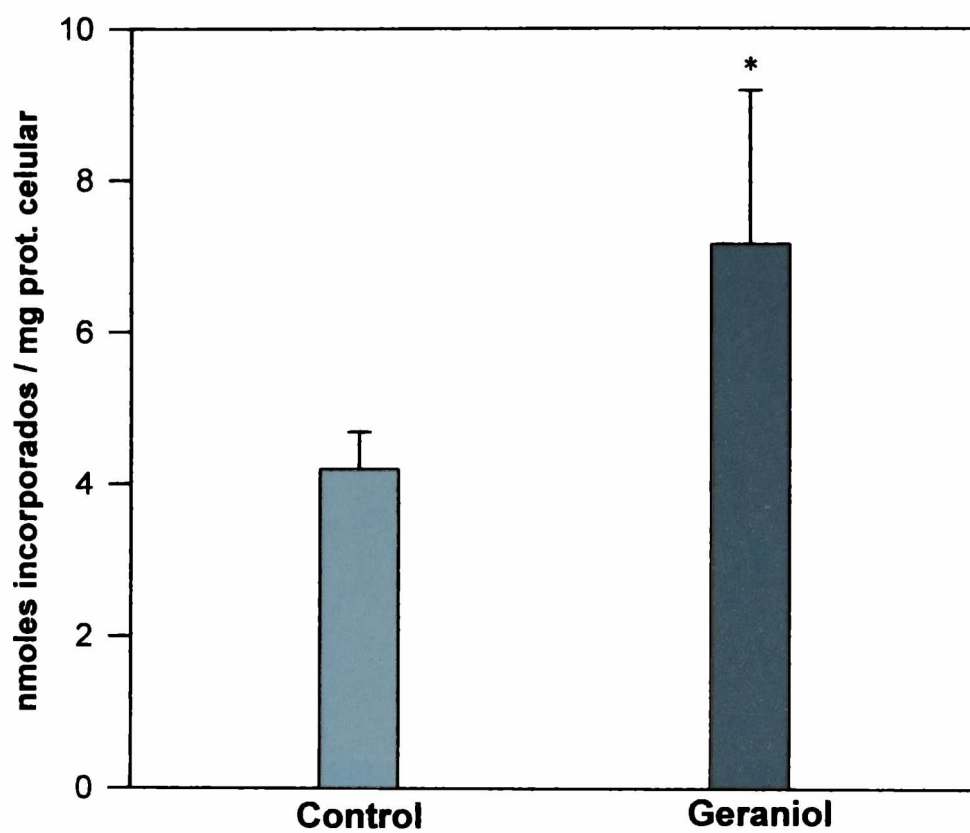
### **III.F.4.CAPTACION Y METABOLIZACION DE ACIDO DIHOMO- $\gamma$ -LINOLENICO EN CELULAS A549 TRATADAS CON GERANIOL. ACTIVIDAD $\Delta 5$ DESATURASA.**

Al estudiar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de células A549 tratadas con geraniol 600  $\mu$ M, se observan cambios que estarían indicando en forma indirecta una disminución de la actividad  $\Delta 6$  y  $\Delta 9$  desaturasa, no pudiendo inferirse nada acerca de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa. Con el propósito de determinar la actividad de dicha enzima en las células sometidas a tratamiento con geraniol y comparar los resultados obtenidos con el tratamiento con simvastatin se procedió a incubar a las células con [1- $^{14}$ C] ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico en las condiciones descritas en el ítem III.D., reemplazando el simvastatin por geraniol a una concentración de 600  $\mu$ M.

Los resultados indican (figura III.19) que las células tratadas con geraniol muestran una mayor incorporación de 20:3 n-6. Al estudiar la metabolización de este ácido (figura III.20) se observa que la conversión en araquidonato está disminuida por el tratamiento, lo que estaría indicando una inhibición de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa.



FIGURA III.19.

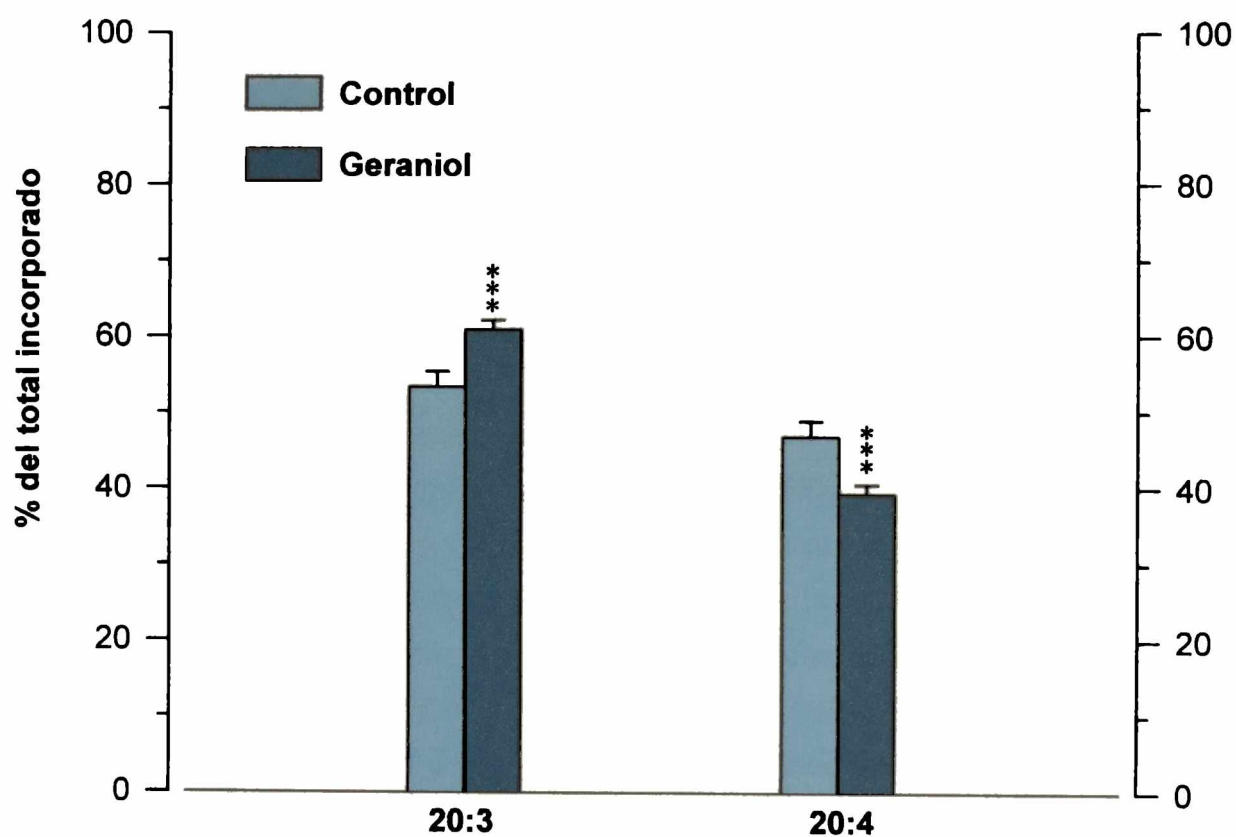
INCORPORACION DE [1-<sup>14</sup>C] ACIDO DIHOMO- $\gamma$ -LINOLENICO EN CELULAS A549

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*)  $p < 0,05$

FIGURA III.20.

DISTRIBUCION DE LA RADIATIVIDAD INCORPORADA EN LOS PRODUCTOS DE METABOLIZACION DEL [1-<sup>14</sup>C] ACIDO DIHOMO- $\gamma$ -LINOLENICO EN CELULAS A 549 TRATADAS CON GERANIOL



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*\*\*)  $p < 0,0001$

### **III.G.DISCUSION**

#### **III.G.1.EFECTOS DEL SIMVASTATIN Y EL GERANIOL SOBRE LA PROLIFERACION Y EL METABOLISMO LIPIDICO DE CELULAS A549 EN CULTIVO.**

En la introducción de esta tesis se discutió ampliamente el rol del mevalonato sobre la proliferación celular, no sólo por ser precursor de colesterol sino también de numerosas proteínas isopreniladas involucradas directa o indirectamente con la replicación del ADN y la división celular (*Chen, 1975; Quesney-Huneus y col., 1979, Goldstein y Brown, 1990; Rao, 1995; Vogt y col., 1995, Crick y col., 1998; Sinensky, 2000; Takai y col., 2001*). Se podría entonces interferir en los procesos de proliferación celular utilizando inhibidores de la HMG-CoA reductasa, cuyo producto de reacción es el mevalonato (*Habenicht y col., 1980; Quesney-Huneus y col., 1983; Siperstein 1984; Buchwald, 1992; Crowell y col., 1992; Bennis y col., 1993; Cuthbert y Lipsky, 1997; Singh y col., 2003*).

Existen numerosos reportes sobre la inhibición de la proliferación de células en cultivo utilizando inhibidores de la reductasa, como los estatines o los monoterpenos (*Kandutsch y Chen, 1977; Kawata y col., 1994; Burke y col., 1997; Elson y col.,1999;Ferri y col., 2001; Bardon y col., 2002; Peffley y col., 2002; Seeger y col, 2003; Chan y col., 2003*). En este trabajo se encontró que, tanto el simvastatin a una concentración de 90  $\mu\text{M}$  (*Bellini y col., 2003*) como el geraniol a una concentración de 600  $\mu\text{M}$ , son capaces de reprimir la proliferación de las células A549 en cultivo luego de 48 horas de tratamiento.

Uno de los objetivos planteados en esta tesis fue estudiar la influencia del simvastatin y del geraniol sobre distintos aspectos del metabolismo lipídico de estas células, tanto sobre la vía del mevalonato como sobre la síntesis de ácidos grasos. Dado que ambos inhibidores presentan distintos mecanismos de acción sobre la actividad reductasa (*Endo y col., 1976; Alberts y col, 1980; Hoeg y Brewer, 1987; Qureski y col, 1988; Goldstein y Brown, 1990; Clegg y col, 1992; Peffley y col., 2003; Wierzbicki y col.,2003*), resulta interesante comparar los posibles efectos que puedan tener sobre los aspectos antes mencionados.

Al analizar el contenido de fosfolípidos en células tratadas con simvastatin, se observó un aumento significativo de estos lípidos celulares, esto estaría de acuerdo con un aumento en la síntesis de membranas internas concomitante a un aumento en la síntesis de reductasa, descrito por Goldstein y Brown (**Brown y Goldstein, 1980; Goldstein y Brown, 1990**), como mecanismo compensatorio tendiente a revertir los efectos del inhibidor. Este aumento en la síntesis de membranas internas también podría deberse a un aumento en la síntesis de las enzimas del sistema P450 como respuesta a la presencia de xenobióticos, en este caso el simvastatin (**Rebuffat y col., 1988; McLaughlin y col., 1999**)

Respecto al contenido de colesterol se encontró que el mismo no se encuentra modificado comparado con el control. Esto podría explicarse de dos maneras: o las células logran inducir la reductasa de manera tal de contrarrestar el efecto causado sobre la síntesis de mevalonato y colesterol por el simvastatin, o bien no se observa un cambio neto porque las células aumentan su incorporación desde el medio.

Con el objetivo de dilucidar estas hipótesis se midió la incorporación de colesterol y la incorporación y metabolización de acetato radiactivos. Las medidas de incorporación de  $^3\text{H}$ -colesterol muestran que, efectivamente, el simvastatin causa un aumento de la incorporación de este esterol, lo que confirmaría una de las posibles explicaciones respecto al contenido de colesterol no modificado.

La otra posible explicación quedaría descartada, en parte, al analizar la incorporación y metabolización de  $^{14}\text{C}$ -acetato. Los resultados indican que el simvastatin ocasiona una disminución de casi un 50% respecto al control de la radiactividad incorporada en lípidos insaponificables. Estos datos confirman que las células no pueden revertir totalmente la inhibición en la síntesis de colesterol causada por el tratamiento con simvastatin. Esta inhibición del 50% en la síntesis de colesterol se correlaciona con un aumento en la incorporación desde el medio de casi un 60%. Por lo que se postula que el contenido de colesterol no modificado se debe principalmente a un aumento de la incorporación de colesterol exógeno.

Respecto a la distribución de la radiactividad a partir de acetato en los lípidos insaponificables de células tratadas con simvastatin, ésta se encuentra fundamentalmente en colesterol, principal producto final de la vía. El acetato incorporado que no es metabolizado a lípidos insaponificables se convierte en

acetilCo-A, incorporándose en ácidos grasos. Las células tratadas muestran así un aumento de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato en estos lípidos. Esto podría deberse a un aumento en la actividad de la ácido graso sintasa mediado por SREBP, en respuesta a los cambios en la composición lipídica de las membranas (**Horton y col., 2002**).

Cuando se comparan estos resultados obtenidos con simvastatin respecto a los obtenidos con geraniol, se ponen en evidencia los distintos mecanismos de acción que presentan ambas sustancias (**Endo y col., 1976; Alberts y col., 1980; Hoeg y Brewer, 1987; Qureski y col., 1988; Goldstein y Brown, 1990; Clegg y col., 1992; Peffley y col., 2003; Wierzbicki y col., 2003**).

En las células tratadas con geraniol el contenido colesterol y fosfolípidos, al contrario de lo que sucede en las células tratadas con simvastatin, se encuentra disminuido. Respecto al contenido de colesterol disminuido cabe recordar que por efecto del geraniol disminuye la cantidad de HMG-CoA reductasa por distintos mecanismos (ver introducción) (**Clegg y col., 1982; Qureshi y col., 1988, Peffley y col., 2003**). Esta disminución en la cantidad de enzima llevaría a una disminución del contenido de mevalonato y, consecuentemente, de colesterol; ya que el mevalonato disponible sería destinado preferencialmente a la síntesis de isoprenoides no esteroides y no de colesterol (**Goldstein y Brown, 1990**). El contenido de fosfolípidos disminuido podría explicarse asumiendo que el geraniol inhibe alguna enzima directamente involucrada en la síntesis de estos lípidos, independientemente de la regulación vía SREBPs descrita en la introducción (**Kim y Speigelman, 1996; Shimano y col., 1997; Horton y col., 2002**). De hecho, en experimentos realizados en nuestro laboratorio en otra línea celular, se encontró que el geraniol inhibe la síntesis de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés), posiblemente debido a la acumulación de algún metabolito intermediario causada por una inhibición de la conversión de lanosterol en colesterol por geraniol (**Polo y col., 2003**). Si bien los resultados obtenidos en este capítulo sobre la distribución de  $^{14}\text{C}$ -acetato en lípidos insaponificables no reflejan tal inhibición y, no se midió directamente la síntesis de PC, esta hipótesis no puede descartarse y sería una posible explicación a los resultados obtenidos respecto al contenido de fosfolípidos disminuido en presencia de geraniol.



Los datos de incorporación de los distintos sustratos radiactivos ensayados resultan contradictorios, ya que si bien se observó que el geraniol ocasiona una disminución en la captación de colesterol exógeno, lo que podría explicar la disminución en el contenido de colesterol, la síntesis del mismo a partir de  $^{14}\text{C}$ -acetato se encuentra significativamente aumentada. Esta observación conduce a pensar que las células estarían desarrollando un mecanismo compensatorio, tendiente a suplir sus requerimientos de esteroides aumentando la síntesis de los lípidos insaponificables. Este mecanismo resultaría insuficiente, al menos en las condiciones ensayadas, para normalizar los niveles de colesterol. Al analizar la distribución de la radiactividad en estos lípidos insaponificables, se observa que la misma se distribuye no sólo en colesterol, sino también en sus precursores, al igual que en las células control y a diferencia de las células tratadas con simvastatin, donde únicamente se encontró radiactividad en colesterol.

Podría pensarse que el aumento en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato en lípidos insaponificables es inespecífico, debido posiblemente a una disminución del pool de acetato endógeno. Esto se reflejaría en un aumento de la radiactividad en todos los otros pools celulares que utilizan acetato como sustrato (*Cerda y col., 1999*). Los resultados de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato en ácidos grasos confirman esta posibilidad, ya que muestran un aumento de la radiactividad en estos lípidos.

### **III.G.2.METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS EN CELULAS A549 TRATADAS CON SIMVASTATIN Y GERANIOL**

Está ampliamente discutido que la regulación de la síntesis de colesterol y ácidos grasos parecen estar relacionadas (*Worgall y col, 1998; Ridgway y col., 1999; Horton y col., 2002*) y se ha reportado que los estatines son capaces de modificar la actividad de las desaturasas en líneas celulares en cultivo (*Galli y col, 1997; Rise y col, 1997, 2002, 2003*). Por este motivo se decidió estudiar la influencia que podían tener el simvastatin y el geraniol sobre la incorporación y metabolización de ácidos grasos radiactivos adicionados al medio de cultivo.

Se encontró que las células A549 presentan actividades  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas elevadas, comparadas con otras líneas celulares tumorales, en las cuales los

niveles detectados de estas desaturasas resultaron bajos (*Dunbar y col., 1975; Albino y col, 2001*). Además presentan actividad  $\Delta 9$  desaturasa.

En las células A549 el tratamiento con simvastatin 90  $\mu\text{M}$ , provoca un incremento importante de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa respecto de las células control, lo cual se desprende del aumento en la conversión de  $[1-^{14}\text{C}] 20:3 \text{ n-6}$  a  $[1-^{14}\text{C}] 20:4 \text{ n-6}$  (aproximadamente un 20%), que resulta una medida directa de la actividad de esta enzima. Este hallazgo no se refleja directamente en la composición de ácidos grasos de fosfolípidos, encontrándose solamente un aumento significativo del 22:6 n-3, lo cual reafirma la existencia de actividad  $\Delta 6$  desaturasa y soporta la idea de una actividad  $\Delta 5$  desaturasa aumentada.

Respecto a la actividad de la  $\Delta 9$  desaturasa, de acuerdo a los resultados obtenidos, el ácido palmítico radiactivo es desaturado en la posición 9 por esta enzima, obteniéndose 16:1 n-7. Esta metabolización está aumentada por el tratamiento con simvastatin, de acuerdo a lo que se observa en la figura III.12. Además se observa un aumento del 18:1 radiactivo, proveniente de la desaturación del 18:0 por acción de la  $\Delta 9$  o de la elongación del 16:1 n-7. Este aumento, sumado al de la metabolización del 16:0, podría deberse a un aumento de la actividad  $\Delta 9$  desaturasa y/o a un aumento de la actividad de las enzimas elongantes causado por el tratamiento. Ambos supuestos se sustentan con el aumento encontrado en 18:0, producto de la elongación del 16:0, y con el aumento en la relación  $(16:1+18:1)/ 18:0$  ( $1,54 \pm 0,19$  vs  $1,18 \pm 0,09$ ) en células tratadas con respecto a células control. Cabe mencionar que la expresión de la  $\Delta 9$  desaturasa y de las enzimas elongantes son reguladas por los SREBP-1a y -1c (*Ntambi, 1999; Repa y col., 2002*).

Al analizar la metabolización de ácido  $\alpha$ -linolénico, no puede concluirse nada sobre la actividad  $\Delta 6$  desaturasa, sin embargo, el aumento encontrado en la relación 20:5/20:4 es consecuente con el aumento encontrado en la actividad  $\Delta 5$  desaturasa (ver tabla III.3).

El aumento de la formación de ácidos grasos monoinsaturados a partir de  $^{14}\text{C}$  acetato y del índice de insaturación encontrado en los ácidos grasos de fosfolípidos soportan la idea de una estimulación generalizada en la desaturación de

ácidos grasos causada por simvastatin (**Galli, 1997; Bellini y col., 2003; Rise y col., 2003**).

En resumen en la línea celular A549, el simvastatin modifica la insaturación de ácidos grasos suplementados en forma exógena y de ácidos grasos formados a partir de precursores endógenos, resultando en un aumento del grado de insaturación de los fosfolípidos celulares. Los mecanismos no son claros, tal vez los cambios en el entorno lipídico de las enzimas involucradas en la metabolización de ácidos grasos, causados por la droga, podrían tener un papel en el proceso descrito.

Nuevamente, los resultados obtenidos con geraniol resultan distintos a los obtenidos con simvastatin. Al analizar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos, se encontró que el geraniol ocasiona una disminución en el contenido de 16:1 n-7 y 18:1 n-9, acompañada con un aumento en la relación 16:0/16:1 y 18:0/18:1, posiblemente debido a una disminución de la actividad  $\Delta 9$  desaturasa. Este hecho no podría explicarse a través de un mecanismo mediado por SREBPs. Cabe recordar que las células presentan un contenido de colesterol disminuido causado por geraniol, por lo tanto el procesamiento de SREBPs tendría que estar aumentado y consecuentemente la transcripción del gen de la  $\Delta 9$  desaturasa (**Edwards y Ericsson, 1999; Ridgway y col., 1999; Goldstein y col., 2002**), a menos que esta línea celular no exprese los SREBPs-1a ó -1c, que son los directamente involucrados con la lipogénesis (**Kim y Speigelman, 1996; Shimano y col., 1997, Horton y col., 2002**), o los exprese en muy baja proporción (**Osborne, 2002**).

La actividad  $\Delta 6$  desaturasa también parece estar disminuída, lo cual se infiere de la disminución en el contenido de 18:3 n-6 observado en la composición.

Los datos de composición no aportan información acerca de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa, razón por la cual se decidió medir dicha actividad incubando a las células con ácido  $^{14}\text{C}$ -dihomo- $\gamma$ -linolénico. Las células tratadas con geraniol presentan un aumento en la incorporación de 20:3 n-6. Posiblemente al tener una  $\Delta 6$  destaurasa disminuida y un contenido de 18:3 n-6 también disminuido las células tendrían una gran avidez por 20:3 n-6, ya que su producto de desaturación es el 20:4 n-6, el cual tiene múltiples funciones biológicas y es precursor de numerosas



moléculas que presentan estas funciones (**Connor y Neuringer, 1988; Galli y Marangoni, 1997; Calviello, 1998**)

El tratamiento con geraniol ocasionaría una disminución de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa, lo cual se deduce de la disminución en la conversión de 20:3 n-6 en araquidónico observada en las células tratadas.

### **III.G.3.VIA DEL MEVALONATO EN CELULAS A549 TRATADAS CON SIMVASTATIN.**

Otro de los objetivos planteados fue estudiar el efecto de algún inhibidor de la vía del mevalonato sobre la incorporación y metabolización de  $^3\text{H}$ -mevalonato exógeno. Se decidió utilizar simvastatin.

Los resultados muestran un aumento en la incorporación de mevalonato radiactivo en las células tratadas respecto las células control. Esto puede explicarse porque en estas células, al existir un bloqueo de la síntesis de mevalonato por simvastatin, se encuentra disminuido el pool endógeno lo cual ocasiona un aumento de la incorporación exógena.

Al analizar la distribución del mevalonato incorporado se encontró que la radiactividad incorporada sólo está significativamente aumentada en la fracción proteica, lo cual estaría indicando que las células dirigen este mevalonato preferencialmente hacia la síntesis de grupos isoprenilos que se unirían a distintas proteínas celulares (**Goldstein y Brown, 1990; Sepp-Lorenzino, 1991; Gelb y col., 1998; Parmryd y Dallner, 1999; Sinensky, 2000**). Esto concuerda con el hecho de que las enzimas involucradas en la síntesis de estos grupos tienen mayor afinidad por el mevalonato que las enzimas involucradas en la síntesis de esteroides (**Goldstein y Brown, 1990; Gelb y col., 1998**). Además ya ha sido descrito que en células A549 la actividad reductasa dirigida a productos no esteroides es mayor que en fibroblastos (**Bennis y col., 1993**), por lo tanto es lógico pensar que si estas células están deprivadas de mevalonato al recibir mevalonato exógeno lo derivarán mayoritariamente a este tipo de productos.

Los resultados de la distribución de la radiactividad en lípidos muestran, sorprendentemente, una disminución de la incorporación de mevalonato en lípidos insaponificables y un aumento en ácidos grasos. Esta observación indicaría que el

simvastatin estaría inhibiendo otra enzima de la vía de síntesis de esteroides más allá de la HMG-CoA reductasa. Además pone de manifiesto que las células presentan la vía propuesta por Popjak (**Popjak, 1971**), que retroconvierte el mevalonato a HMG-CoA y esta a acetil-CoA, la cual se incorporaría en ácidos grasos.

Con respecto a la radiactividad incorporada en lípidos insaponificables, observamos una disminución en la incorporación porcentual en colesterol y un aumento en lanosterol y escualeno, lo que reafirmaría una inhibición adicional, más allá de la inhibición ejercida sobre la actividad reductasa y posiblemente en la conversión de lanosterol en colesterol. Esto explicaría además la radiactividad encontrada en dolicol que no es detectada en células control. El mevalonato incorporado al no poder ser metabolizado a colesterol, es derivado a otros productos minoritarios de la vía como el dolicol. Este isoprenoide resulta de suma importancia en esta línea celular, dado que las células A549 son productoras de líquido surfactante (**Lieber y col., 1976**), que presenta un alto contenido de proteínas glicosiladas, estando el dolicol directamente relacionado con la producción de las mismas (**Daniels y Orgeig, 2003**).

De estos resultados se puede concluir que el simvastatin afectaría la metabolización del mevalonato independientemente de su efecto inhibitorio sobre la reductasa.

# CAPITULO IV

*MODELO DE TUMOR A549/RATONES ATIMICOS  
CARACTERIZACION Y EFECTOS SOBRE EL  
METABOLISMO LIPIDICO*

## **CARACTERIZACION DEL TUMOR DE PULMON HUMANO DERIVADO DE CELULAS A549 DESARROLLADO EN RATONES ATIMICOS. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SIMVASTATIN Y GERANIOL.**

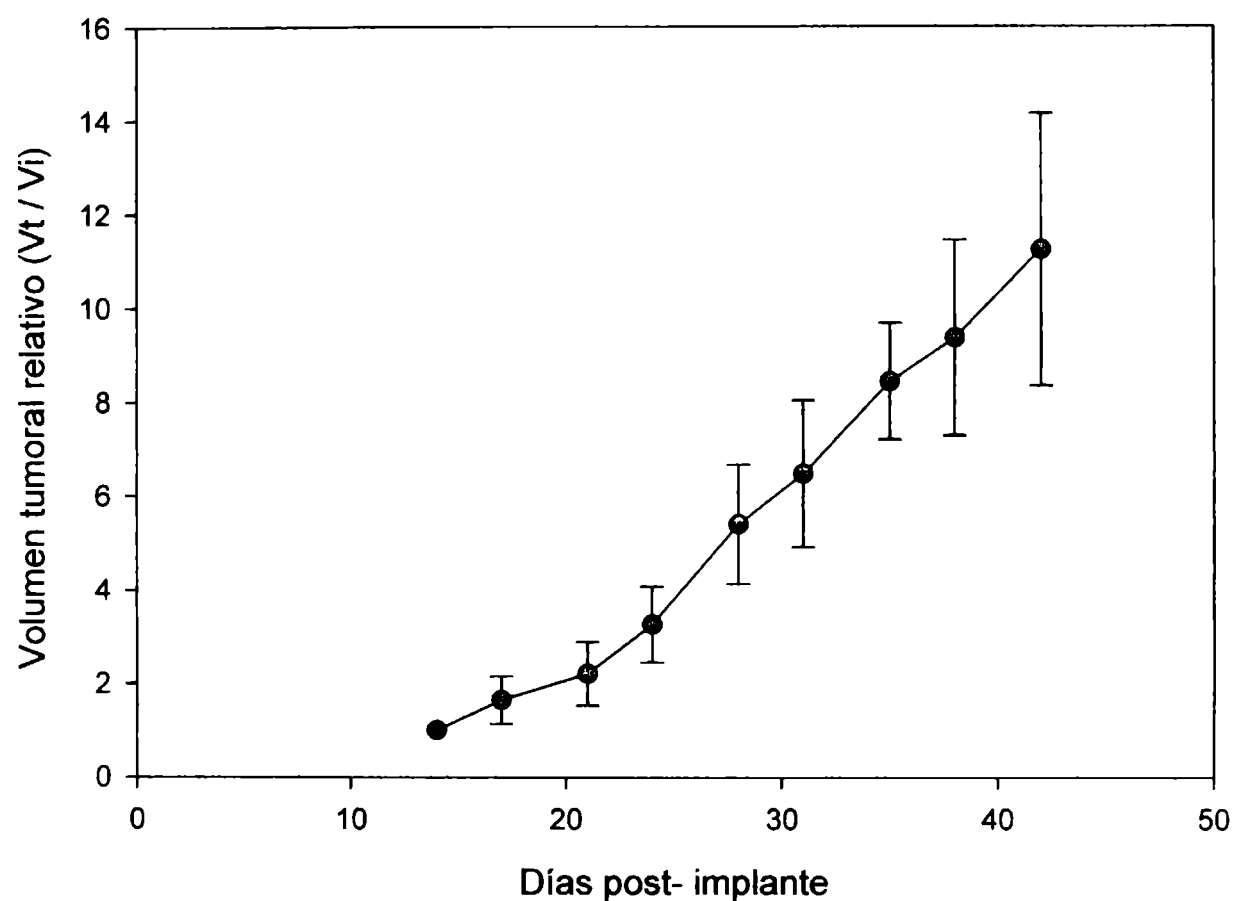
Existe evidencia de que la implantación de tumores en ratones afecta el metabolismo lipídico del huésped, principalmente a nivel hepático (*de Antueno y col., 1987*), sumado a esto, numerosos trabajos describen la inhibición y/o la regresión de distintos tumores en animales sometidos a tratamiento con estatines o con monoterpenos (*Yu y col., 1995; Hawk y col., 1996; Burke y col., 1997; Crowell, 1999; Bodake y col., 2002*). Basados en estos antecedentes, el propósito de los experimentos presentados en este capítulo fue caracterizar el modelo de tumor humano derivado de células A549 en ratones atímicos, no sólo desde el punto de vista del crecimiento tumoral sino también desde distintos aspectos del metabolismo lipídico del huésped y del tumor. Además se estudió la influencia del tratamiento de los animales con simvastatin y geraniol sobre el crecimiento del tumor.

### **IV.A. CURVA DE CRECIMIENTO TUMORAL.**

Con el propósito de evaluar la fase de latencia, el porcentaje de toma ( $n^{\circ}$  de animales con tumor  $\times 100 / n^{\circ}$  animales inoculados) y el tiempo de duplicación tumoral los animales fueron inoculados con una suspensión de células tumorales como se describe en II.B.3.b de Materiales y Métodos. Los animales fueron alimentados "ad libitum" y pesados dos veces por semana, el volumen tumoral también se midió dos veces por semana de la forma descrita en el ítem II.B.3.c. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.1.

La presencia del tumor no afectó el peso de los animales (datos no mostrados). El tumor presenta un porcentaje de toma de un 80% (4 de 5 animales desarrollaron tumor) y un tiempo de latencia (tiempo transcurrido desde el implante hasta la aparición de un tumor medible) de unos 14 días. La tasa de duplicación es de aproximadamente 8 días.

**FIGURA IV.1**  
**CURVA DECRETIMIENTO TUMORAL**



Los valores representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

#### **IV.B.EFECTO DE LA PRESENCIA DEL TUMOR SOBRE DISTINTOS ASPECTOS DEL METABOLISMO LIPIDICO DEL ANIMAL HUESPED.**

A los efectos de evaluar la influencia del tumor sobre el metabolismo lipídico del animal huésped se procedió a determinar el contenido de colesterol plasmático, hepático y tumoral. Además se determinó la composición de ácidos grasos de fosfolípidos plasmáticos, hepáticos y tumorales.

Con el objetivo de analizar si el tumor tenía influencia no sólo en el contenido de colesterol y ácidos grasos del huésped sino también en la síntesis de los mismos, se determinó la actividad de las enzimas desaturantes en microsomas hepáticos y se estudió la incorporación y metabolización de mevalonato radiactivo en distintos tejidos.

Para la realización de estos experimentos se dispuso de dos grupos de animales: no portador y portador de tumor.

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 500-2000 mm<sup>3</sup> se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se les extrajo sangre por punción cardíaca y se removieron quirúrgicamente hígado y tumor.

#### **IV.B.1.CONTENIDO DE COLESTEROL.**

El contenido de colesterol plasmático fue determinado mediante un kit enzimático método CHOD-PAD (*Siedel y col., 1983*) de Boehringer Mannheim. El contenido de colesterol hepático y tumoral fue determinado según la técnica descrita en Materiales y Métodos (ítem II.B.1.f.), previa extracción de lípidos totales de cada tejido y saponificación de las muestras, de manera tal de cuantificar el colesterol total (ver ítems II.B.1.a. y II.B.1.b.)

Los resultados (tabla IV.1) muestran un aumento de la colesterolemia, sin observarse cambios en el contenido de colesterol hepático en animales portadores.

**TABLA IV.1.****CONTENIDO DE COLESTEROL PLASMÁTICO, HEPÁTICO Y TUMORAL**

Los valores de colesterolemia se expresan en g de colesterol total/l de plasma y los valores de colesterol tisular se expresan en mg de colesterol total/ g tejido.

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones.

Tejido	Colesterol total	
	No portador	Portador
Plasma	0,80 $\pm$ 0,08	2,16 $\pm$ 0,81**
Hígado	1,13 $\pm$ 0,18	2,36 $\pm$ 0,80
Tumor	-----	1,28 $\pm$ 0,36

(\*\*)  $p < 0,01$

**IV.B.2. COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS.**

Para la determinación de la composición porcentual de ácidos grasos de fosfolípidos de hígado, tumor y plasma se realizó la extracción de lípidos totales por el método de Folch (ver ítem II.B.1.a.). Luego se separaron los lípidos neutros de los fosfolípidos y se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos según se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en las tablas IV.2. y IV.3. La presencia del tumor parece no afectar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos tanto plasmáticos como hepáticos. Respecto a la composición de ácidos grasos de tumor, se puede observar un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados con un bajo porcentaje de polinosaturados.

**TABLA IV.2.****DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS PLASMATICOS EN ANIMALES NO PORTADORES Y PORTADORES DE TUMOR**

Sólo se consideraron los ácidos grasos principales. Índice de insaturación =  $II = \sum \% \text{ de ácido graso} \times n^{\circ} \text{ de dobles ligaduras del ácido graso.}$

Los resultados representan la media  $\pm$  DS de 4 determinaciones independientes.

<b>ACIDO GRASO</b>	<b>NO PORTADOR</b>	<b>PORTADOR</b>
<b>16:0</b>	31,4 $\pm$ 2,1	31,2 $\pm$ 2,0
<b>17:0</b>	1,0 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2
<b>18:0</b>	23,3 $\pm$ 4,1	23,5 $\pm$ 4,1
<b>18:1 n-9</b>	23,3 $\pm$ 4,1	23,5 $\pm$ 4,1
<b>18:1 n-7</b>	1,5 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
<b>18:2 n-6</b>	14,8 $\pm$ 2,9	15,1 $\pm$ 2,8
<b>20:4 n-6</b>	12,7 $\pm$ 2,6	12,8 $\pm$ 2,6
<b>22:6 n-3</b>	4,8 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 1,3
<b>18:0/18:1</b>	1,9 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3
<b>18:2/20:4</b>	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,0
<b>Sum. Saturados</b>	55,7 $\pm$ 6,4	55,6 $\pm$ 6,4
<b>Sum. n-6</b>	27,5 $\pm$ 5,6	24,7 $\pm$ 12,7
<b>Sum n-3</b>	4,8 $\pm$ 1,8	4,3 $\pm$ 1,3
<b>II</b>	122,5 $\pm$ 23,7	120,4 $\pm$ 23,2



**TABLA IV.3.**  
**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS**  
**HEPATICOS Y TUMORALES**

ACIDO GRASO	TEJIDO		
	HIGADO		TUMOR
	NO PORTADOR	PORTADOR	
14:0	-----	-----	1,3 ± 0,4
15:0	-----	-----	0,4 ± 0,1
16:0	33,9 ± 6,9	29,0 ± 2,6	36,0 ± 2,0
16:1 n-7	-----	-----	6,5 ± 2,4
17:0	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0
18:0	23,0 ± 2,9	19,6 ± 3,7	24,5 ± 2,4
18:1 n-9	7,3 ± 1,8	8,1 ± 3,3	21,1 ± 1,8
18:1 n-7	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,4	4,9 ± 1,1
18:2 n-6	14,8 ± 2,6	14,2 ± 2,1	4,1 ± 2,0
20:4 n-6	13,4 ± 6,5	17,0 ± 2,2	-----
22:6 n-3	5,5 ± 3,4	6,6 ± 1,3	0,7 ± 0,3
16:0/16:1	-----	-----	5,7 ± 0,9
18:0/18:1	2,9 ± 1,1	2,2 ± 0,8	1,0 ± 0,2
18:2/20:4	1,5 ± 1,0	1,0 ± 0,2	-----
<b>Sum. Saturados</b>	<b>57,7 ± 9,5</b>	<b>49,1 ± 5,0</b>	<b>37,6 ± 2,4</b>
<b>Sum. n-6</b>	<b>5,5 ± 3,4</b>	<b>6,6 ± 1,3</b>	<b>4,1 ± 2,0</b>
<b>Sum n-3</b>	<b>28,1 ± 6,4</b>	<b>34,2 ± 2,6</b>	<b>0,7 ± 0,3</b>
<b>II</b>	<b>124,6 ± 44,6</b>	<b>152,3 ± 15,7</b>	<b>35,6 ± 10,7</b>

### **IV.B.3. INCORPORACION Y METABOLIZACION DE MEVALONATO RADIATIVO.**

Con el objetivo de evaluar la influencia de la presencia del tumor sobre la incorporación y metabolización de [<sup>3</sup>H]-Mevalonato en distintos tejidos del animal huésped se inyectaron intraperitonealmente 15  $\mu$ Ci de mevalonolactona radiactiva en animales portadores y no portadores de tumor, las inyecciones se realizaron cada 8 horas durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se sacrificaron los animales por dislocación cervical, se extrajo sangre por punción cardíaca y se removieron quirúrgicamente hígado, riñón, corazón y pulmón de animales no portadores y portadores, además del tumor en estos últimos.

Los plasmas fueron procesados y se obtuvieron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos libres, cuantificándose la radiactividad incorporada en estos lípidos.

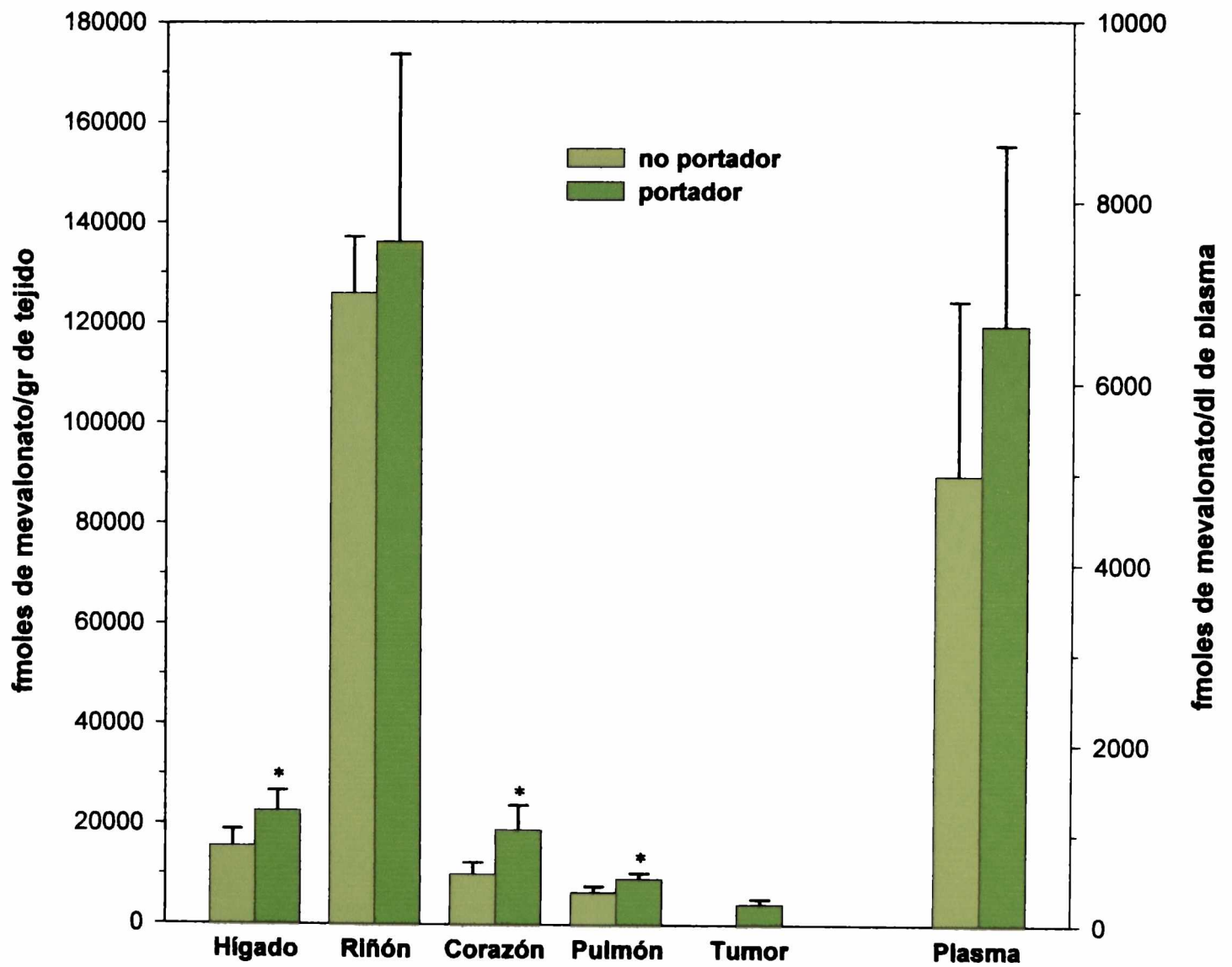
En los distintos tejidos extraídos se separaron las fracciones acuosa, proteica y lipídica según II.B.1.i. y se determinó la radiactividad incorporada.

La fracción lipídica de los distintos tejidos fue posteriormente procesada, obteniéndose los ácidos grasos libres y los lípidos insaponificables, determinándose la radiactividad incorporada. Las distintas especies presentes en el insaponificable de hígado y riñón fueron separadas por TLC y se determinó la distribución relativa de la radiactividad en las mismas.

Los resultados se muestran en las figuras IV.2., IV 3., IV 4.y IV 5. Al analizar los datos se observa que la presencia del tumor tiende a aumentar la incorporación total de mevalonato en todos los tejidos estudiados, haciéndose significativo el aumento en hígado, corazón y pulmón (figura IV.2.). El mayor porcentaje de radiactividad se encuentra en la fracción lipídica (figura IV.3.), además el tumor tiende a aumentar la incorporación total en esta fracción (figura IV.4.), este incremento parece ser a expensas de un aumento en la incorporación en ácidos grasos (figura IV.4.).

En la figura IV.5. se observa que la mayor parte de la marca incorporada en lípidos insaponificables se encuentra en colesterol, encontrándose una disminución en hígado y un aumento no significativo en riñón de animales portadores.

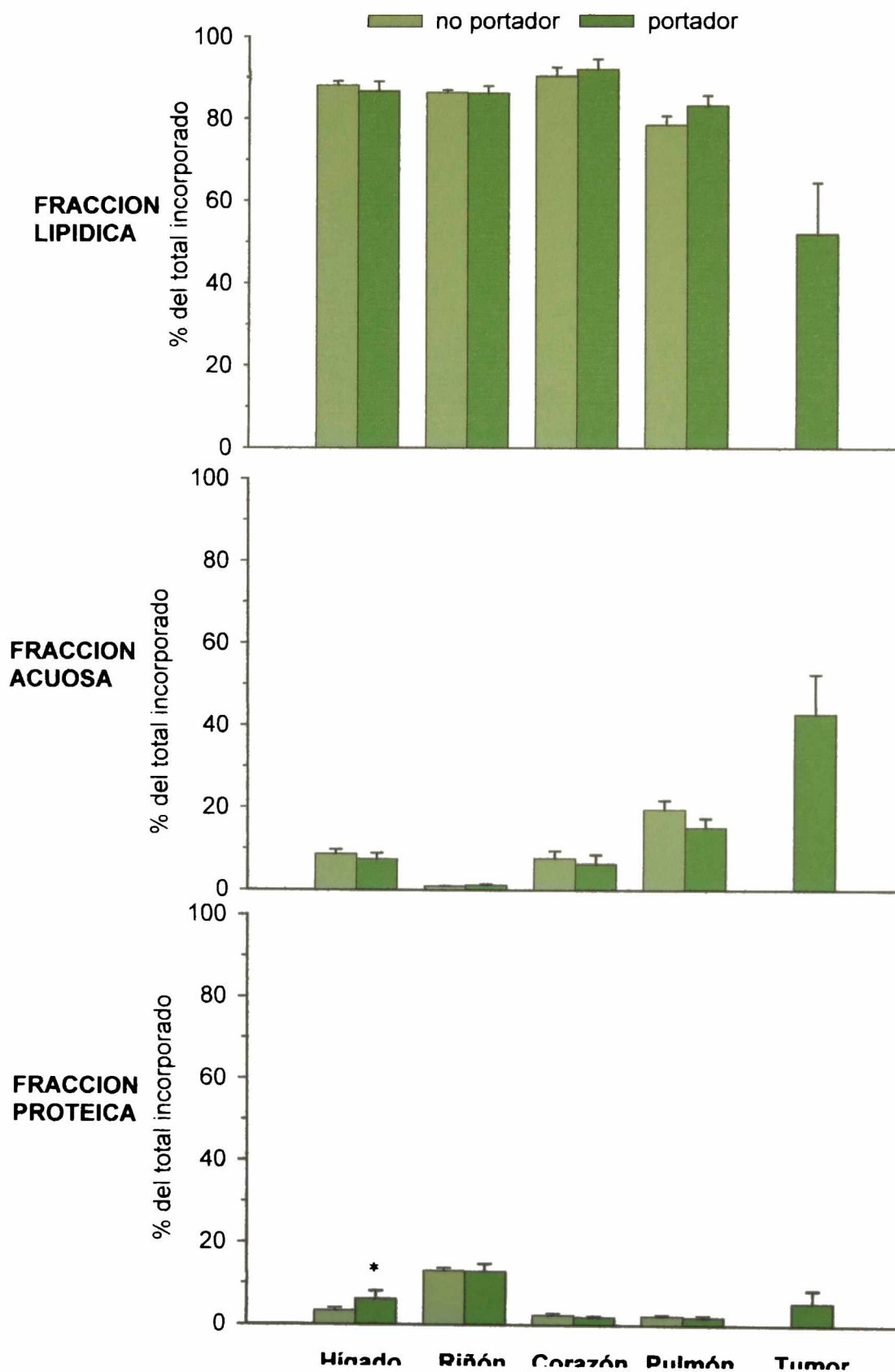
**FIGURA IV.2.**  
**INCORPORACION TOTAL DE MEVALONATO EN DISTINTOS**  
**TEJIDOS DE RATONES NUDE NO PORTADORES Y PORTADORES**  
**DE TUMOR**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones. (\*)  $p < 0,05$

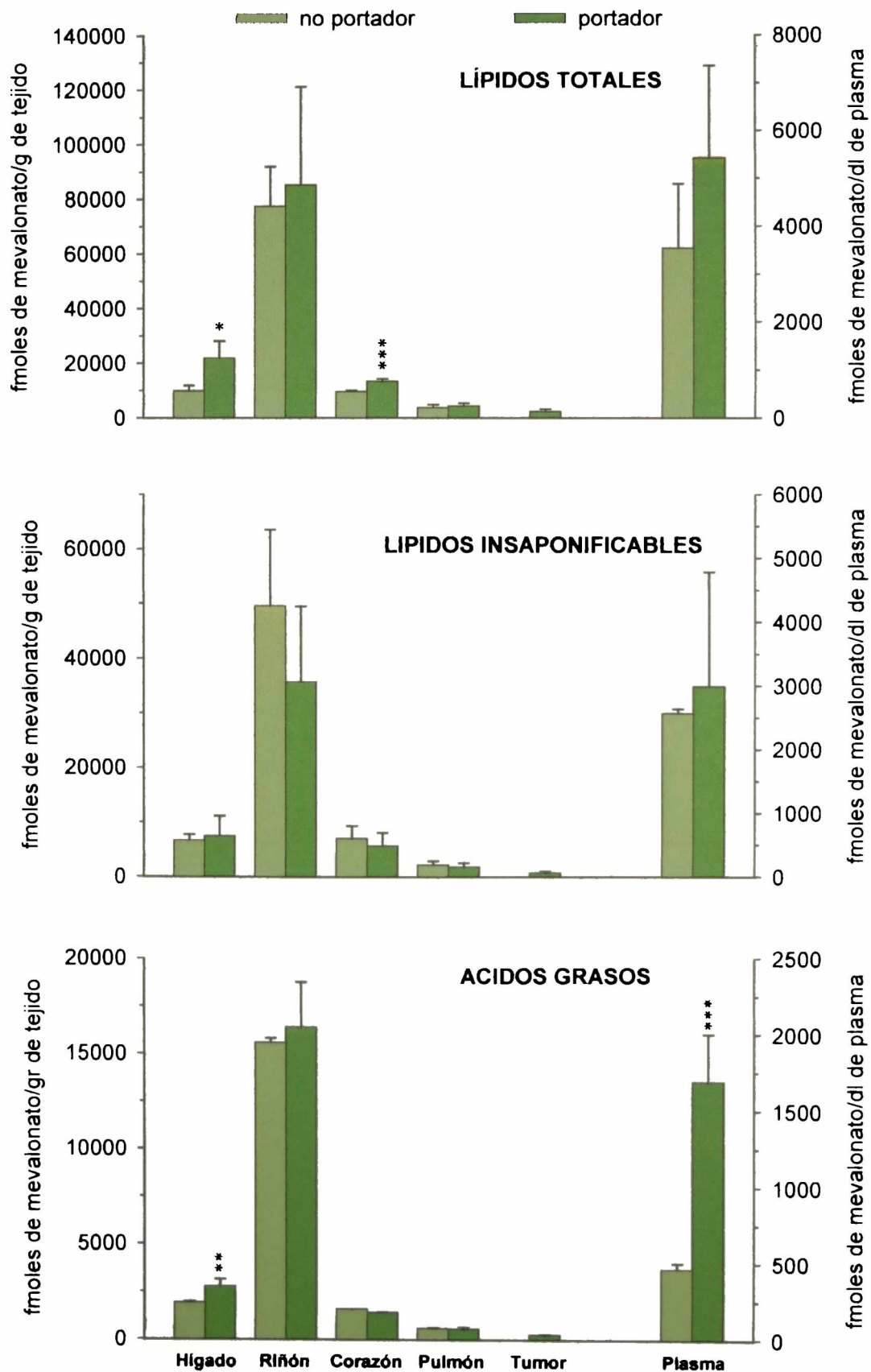
FIGURA IV.3.

**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE MEVALONATO EN FRACCIONES DE TEJIDOS.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones, (\*)  $p < 0,01$

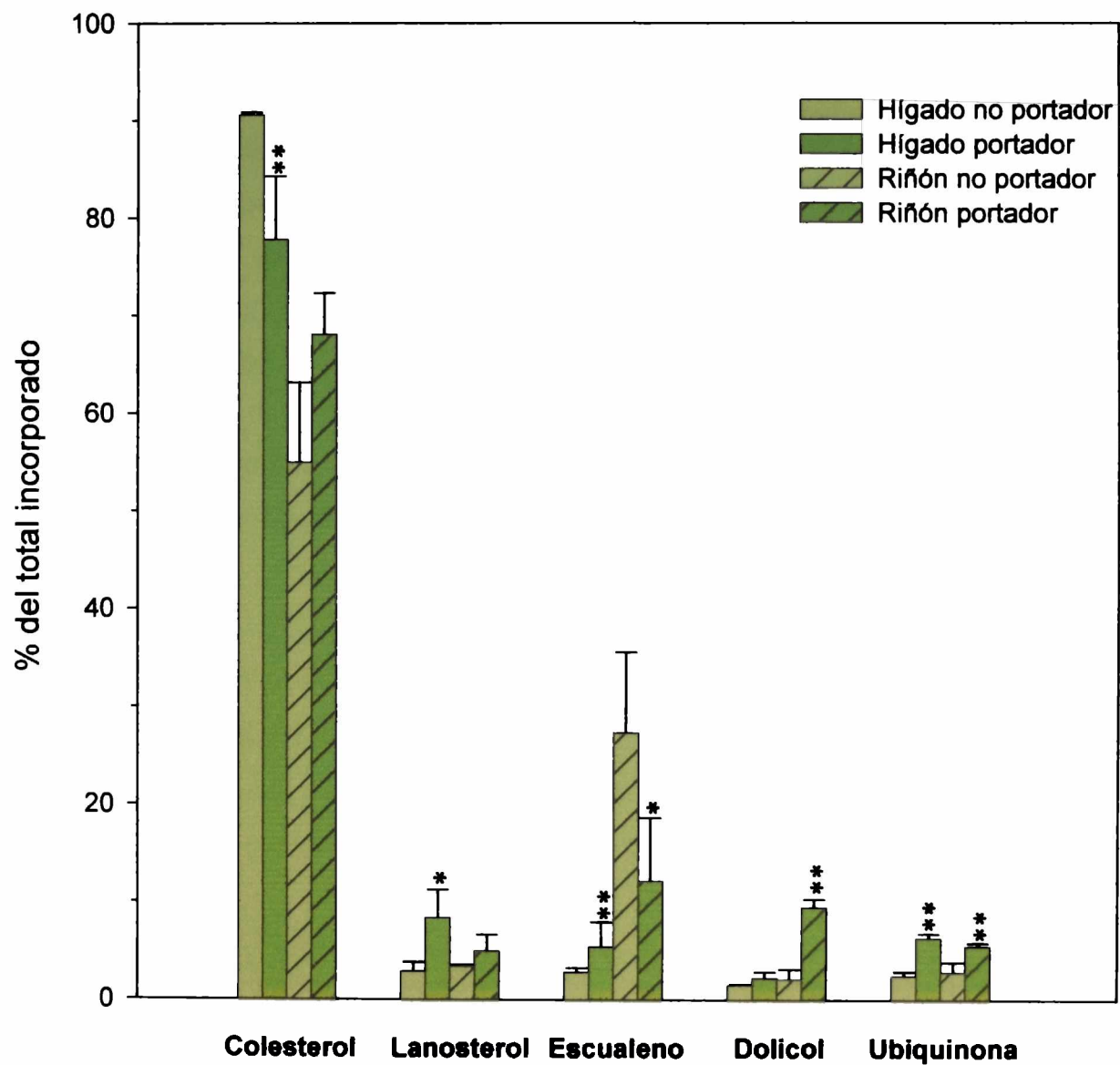


**FIGURA IV.4.**

**INCORPORACION DE MEVALONATO EN LIPIDOS.** Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones, (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  (\*\*\*)  $p < 0,001$ .



**FIGURA IV.5.**  
**DISTRIBUCION DE MEVALONATO EN LIPIDOS INSAPONIFICABLES**  
**DE HIGADO Y RIÑÓN.**



Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones

(\*\*)  $p < 0,01$

#### IV.B.4. ACTIVIDAD DESATURANTE.

En este experimento una vez sacrificados los animales y removidos los hígados y los tumores se aislaron los microsomas de ambos tejidos según la técnica descrita en II.B.2.d. luego de lo cual se determinaron las actividades  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa de acuerdo a la técnica descrita en II.B.2.e.

Los resultados, tabla IV.4., no muestran diferencias en la actividad de la  $\Delta 6$  desaturasa hepática entre animales no portadores y portadores, lo cual es coincidente con la composición de ácidos grasos. La  $\Delta 5$  desaturasa, en cambio, se encuentra significativamente disminuida en microsomas hepáticos de animales portadores de tumor, a pesar de esto la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de estos animales no se encuentra modificada.

Los microsomas tumorales no presentaron actividad desaturante (datos no presentados).

#### TABLA IV.4.

#### ACTIVIDAD $\Delta 5$ Y $\Delta 6$ DESATURANTE DE MICROSOMAS HEPATICOS DE RATONES NUDE NO PORTADORES Y PORTADORES DE TUMOR.

##### *Porcentaje de conversión de los ácidos grasos incubados.*

Desaturasa	Acido incubado	Animal	
		No portador	Portador
$\Delta 5$	[ $^{14}\text{C}$ ] 20:3 n-6	24,24 $\pm$ 3,61	17,75 $\pm$ 3,16*
$\Delta 6$	[ $^{14}\text{C}$ ] $\alpha$ -18:3 n-3	27,36 $\pm$ 4,08	25,01 $\pm$ 3,01

Los datos representan la media  $\pm$  DS de cuatro determinaciones realizadas por duplicado.

(\*)  $p < 0,05$ .

#### **IV.C.EFECTOS DEL SIMVASTATIN Y EL GERANIOL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPATICO Y PLASMATICO.**

En estos experimentos se analizó el efecto del simvastatin y del geraniol sobre el crecimiento y el contenido de colesterol tumoral. También se estudió el efecto de estas sustancias sobre la colesterolemia y el contenido de colesterol hepático en los ratones nude.

Para la realización de estos experimentos se dispuso de dos grupos de animales, no portadores (np) y portadores (p) de tumor. Antes del implante se separaron los animales en lotes control (C), simvastatin (S) y geraniol (G), disponiéndose así de seis lotes en total: Cnp, Cp, Snp, Sp, Gnp y Gp. A los lotes Gnp y Gp se les administró, con la comida, una dosis de 60 mmoles/Kg de dieta de geraniol, comenzando con el tratamiento 14 días antes del implante. A los animales tratados con simvastatin se les administró, con el agua de bebida, una dosis de 50 mg/Kg peso/día de simvastatin comenzando con el tratamiento en el momento del implante. Para poder solubilizar la droga en agua fue necesario transformarla en su sal sódica tal como se describe en Materiales y Métodos.

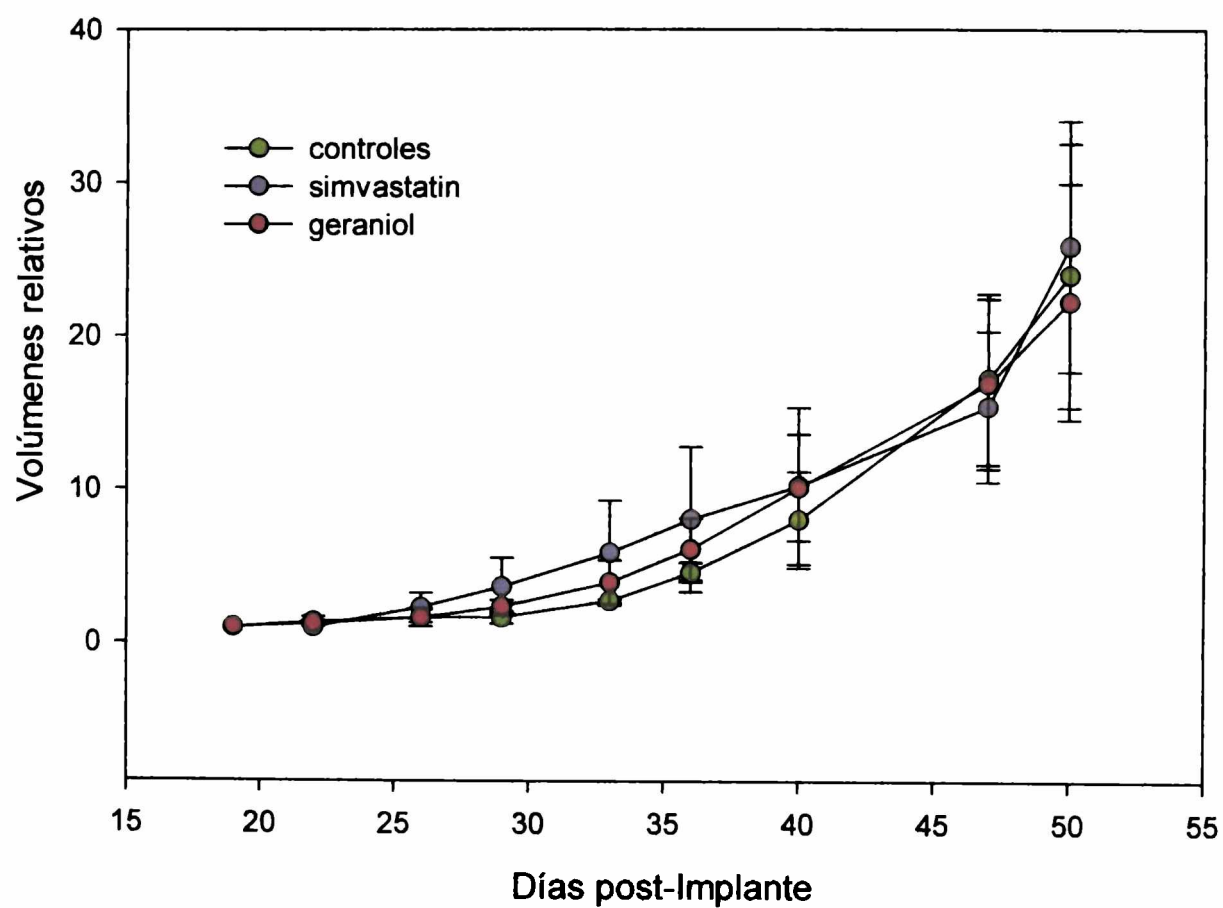
Luego de finalizado el tratamiento se sacrificó a los animales por dislocación cervical, se extrajo sangre por punción cardíaca y se extrajeron quirúrgicamente hígado y tumor para la cuantificación de colesterol tanto en plasma como en tejidos.

Los resultados se muestran en la figura IV.6. y en la tabla IV.5. En las condiciones de trabajo ninguna de las sustancias ensayadas (simvastatin o geraniol) inhiben el crecimiento tumoral. Con respecto al contenido de colesterol hepático no se observan diferencias por la presencia del tumor, salvo en animales portadores tratados con geraniol en los que se observa una disminución. Aparentemente esta disminución parece ser causada por el tratamiento con geraniol más que por el tumor, ya que no se observan cambios en el contenido de colesterol hepático de animales portadores controles, como ya se mencionó. En tumores no se observan diferencias.

La colesterolemia no se ve afectada por los tratamientos en animales no portadores. En animales portadores control y tratados con simvastatin se observa un aumento del colesterol plasmático. el geraniol sin embargo parece



significativamente respecto a los animales no portadores y portadores del lote control, y de animales portadores del lote simvastatin.

**FIGURA IV.6.****EFFECTO DEL SIMVASTATIN Y DEL GERANIOL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL**

**TABLA IV.5.**  
**CONTENIDO DE COLESTEROL HEPATICO, TUMORAL Y PLASMATICO**  
**DE ANIMALES TRATADOS CON SIMVASTATIN Y GERANIOL**

		No portador	Portador	
Colesterolemia (g/ l)	Control	0,80 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,18 <sup>c</sup>	
	Simvastatin	0,79 ± 0,08 a	1,23 ± 0,10 <sup>c</sup>	
	Geraniol	0,98 ± 0,1 <sup>d</sup>	0,84 ± 0,1 <sup>e</sup>	
Colesterol Tisular (mg/ g tejido)	Higado	Control	2,16 ± 0,81 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,80 <sup>a</sup>
		Simvastatin	1,75 ± 0,55	2,49 ± 1,03 <sup>a</sup>
		Geraniol	1,95 ± 0,51	1,05 ± 0,48 <sup>b</sup>
	Tumor	Control	-----	1,28 ± 0,36
		Simvastatin	-----	1,94 ± 0,70
		Geraniol	-----	1,47 ± 0,6

Los datos representan la media ± DS de cuatro determinaciones

(a vs b y d) p < 0,05 / (a vs c) p < 0,01 y (c vs e) p < 0,01

## IV.D.DISCUSION

### IV.D.1.CARACTERIZACION DEL TUMOR DERIVADO DE LA LINEA CELULAR A549 DESARROLLADO EN RATONES NUDE

La línea celular A549 es capaz de generar tumores al ser inyectada en ratones atímicos (*Lieber y col., 1976*). El propósito de este experimento fue caracterizar un tumor desarrollado a partir de esta línea celular, analizando su crecimiento y su composición lipídica.

Los resultados obtenidos muestran que el tumor presenta un tiempo de latencia de 14 días aproximadamente con un porcentaje de toma que varía entre 80-100 %. La tasa de duplicación fue de 8 días. Los animales portadores de tumor no presentaron diferencias en la ingesta de alimentos ni agua respecto al lote no portador, tampoco presentaron variaciones de peso (datos no mostrados).

Comparado el contenido de colesterol de este tumor, con el de otro tumor derivado de pulmón, el HLMC, que fue ampliamente estudiado en nuestro laboratorio (*Polo y col., 1999*), se encontró que es significativamente menor ( $1,28 \pm 0,36$  vs.  $4,17 \pm 0,45$  mg de col/ gr de tejido).

Respecto a la composición de ácidos grasos de fosfolípidos tumorales, se encontró un elevado porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y prácticamente no se encontraron ácidos grasos polinosaturados, a no ser por un escaso 4% de 18:2 n-6 y un 0,7 % de 22:6 n-3, no habiéndose detectado ácido araquidónico. En este sentido el tumor derivado de A549 también muestra otra diferencia respecto del HLMC, este último presentaba un porcentaje mucho mayor de ácidos grasos polinosaturados encontrándose casi un 12% de araquidónico y un 5% de 22:6 n-3 (*de Bravo y col., 1996*). También se encontraron diferencias respecto a la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de la línea celular en cultivo. En ésta el contenido de polinosaturados fue mayor, sobre todo de 20:4 n-6 (5,3 % en la línea celular vs ND en el tumor) y de 22:6 n-3 (3,1 % en la línea en cultivo vs 0,7 % en el tumor). Esto último refleja una diferenciación de las células al ser implantadas en el huésped.

Resumiendo, desde el punto de vista lipídico, el tumor derivado de la línea A549 desarrollado en ratones nude presenta características muy distintas al HMLC a pesar de ser ambos derivados de pulmón.

#### **IV.D.2.METABOLISMO LIPIDICO EN RATONES PORTADORES DE TUMOR**

Basados en datos previos reportados por nuestro laboratorio (*de Antueno y col., 1987*) los cuales demuestran que la presencia de tumor modifica determinados parámetros lipídicos en el animal huésped, se decidió analizar algunos de estos parámetros en este modelo.

##### **IV.D.2.a.CONTENIDO DE COLESTEROL PLASMATICO Y HEPATICO**

Los resultados muestran que la presencia del tumor aumenta la colesterolemia en el animal portador observándose una tendencia a aumentar el contenido de colesterol hepático, aunque la misma no resulta significativa. Estos datos se contraponen con los encontrados en ratones portadores del HLMC, en los cuales tanto la colesterolemia como el contenido de colesterol hepático se encontraban disminuidos (*Polo y de Bravo, 2000*). Esto lleva a pensar en diferentes efectos provocados por ambos tumores sobre el huésped que desencadenarían distintas respuestas en el animal portador.

Esta tendencia a aumentar del contenido de colesterol hepático podría deberse a un aumento de la síntesis o a una disminución del catabolismo en hígado, ocasionado por el tumor. En ambos casos el colesterol hepático aumentaría, con la consecuente disminución de la captación de las LDL plasmáticas y por lo tanto un aumento de la colesterolemia. Sumada a esta disminución de la captación de LDL, el aumento de colesterol hepático podría causar una disminución en la actividad reductasa (*Goldstein y Brown, 1990*). En el caso del HLMC, se demostró que este tumor ocasionaba un aumento de la actividad reductasa hepática, otro punto que marca la diferencia entre ambos tumores (*Polo y col., 1999*).

#### IV.D.2.b. INCORPORACION Y METABOLIZACION DE MEVALONATO EXOGENO POR DIFERENTES TEJIDOS.

El estudio de la incorporación, distribución y metabolización de mevalonato radiactivo por distintos tejidos permite estudiar el requerimiento que tienen de los distintos productos derivados del mismo, así como también la influencia que tiene el tumor sobre la vía.

Al analizar los resultados se encontró que el tumor tiende a aumentar la incorporación de mevalonato en todos los tejidos estudiados, fundamentalmente en la fracción lipídica.

Particularmente en el hígado, este aumento de la incorporación sería un indicador de que el tumor disminuiría la síntesis de mevalonato en este tejido. Esto ocasionaría una disminución en el pool de mevalonato hepático en animales portadores que se refleja en un aumento de la incorporación exógena. Este aumento tendería a compensar la disminución en la cantidad de mevalonato disponible para la síntesis de colesterol. Sin embargo el incremento en la incorporación de mevalonato en lípidos hepáticos se da a expensas de un aumento en ácidos grasos más que en lípidos insaponificables, lo que hace suponer que no podría destinarlo a la síntesis de colesterol por una posible inhibición en la síntesis, más allá de mevalonato. Hecho que concuerda con el aumento encontrado en la incorporación en la fracción proteica.

La distribución de la radiactividad en lípidos insaponificables hepáticos, confirma lo anteriormente propuesto, evidentemente el "hígado portador" presenta una inhibición en la síntesis de colesterol, lo que se refleja en una acumulación de precursores (escualeno y lanosterol) y de otros productos de la vía como dolicol y ubiquinona. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la tendencia a aumentar del contenido de colesterol hepático (ver IV.D.2.a.) se debería más a una disminución del catabolismo que a un aumento de la síntesis, la cual parecería estar inhibida.

Respecto a la gran incorporación encontrada en riñón, coincide con los resultados encontrados por otros autores (*Dietschy y Siperstein; 1967; Righetti y col., 1976; Aguilera y col., 1983; Linares y col., 1983*). Aparentemente el riñón

presenta un pool de mevalonato endógeno muy bajo, por lo cual la incorporación exógena se encontraría incrementada (*Elmberger y col., 1987*).

#### **IV.D.2.c.ACTIVIDAD DESATURANTE**

Como se mencionó en la discusión del capítulo III y en la introducción de esta tesis, existe una relación entre la síntesis de colesterol y la biosíntesis de ácidos grasos (*Ridgway y col., 1999; Horton 2002*). Sería lógico pensar, entonces, que la presencia del tumor además de estar modificando la síntesis de colesterol, de acuerdo a los resultados encontrados, podría modificar también las actividades de las desaturasas hepáticas.

Al estudiar las actividades desaturantes encontramos una disminución en la  $\Delta 5$  desaturación de 20:3 n-6 (28%) en microsomas hepáticos de animales portadores de tumor respecto a animales no portadores, sin observarse cambios significativos en la actividad  $\Delta 6$  desaturasa. En nuestro modelo experimental, la variación en la actividad  $\Delta 5$  desaturasa no se refleja en la composición de ácidos grasos de fosfolípidos, lo cual también ha sido descrito por otros autores (*Georges y col., 1993; de Bravo y col., 1996*).

Uno de los mecanismos posibles, sugeridos para explicar la actividad  $\Delta 5$  desaturasa disminuida en animales portadores, está relacionado con el contenido de colesterol tisular aumentado. Este colesterol podría modificar las propiedades biofísicas del entorno lipídico microsomal que rodea a los sistemas desaturantes (*Leikin y Brenner, 1988*) modificando de esta manera las actividades de las desaturasas.

#### **IV.D.3.EFECTO DEL SIMVASTATIN Y EL GERANIOL SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPATICO Y PLASMATICO.**

La inhibición de la síntesis de mevalonato o de alguna de las reacciones de su vía ha sido ampliamente utilizada *in vivo* (*Sebti y col., 1991; Yu y col., 1995; Hawk y col., 1996; Burke y col., 1997; He y col., 1997; Crowell, 1999; He y col.,*

**Green y Clezardin, 2002) e in vitro (Kandutsch y Chen, 1977; Kawata y col., 1994; Burke y col., 1997; Elson y col., 1999; Ferri y col., 2001; Bardon y col., 2002; Peffley y col., 2002; Seeger y col., 2003; Chan y col., 2003) para inhibir el crecimiento de células tumorales. En este trabajo se encontró que el simvastatin y el geraniol son capaces de inhibir la proliferación de la línea A549, modificando además algunos de sus parámetros lipídicos. Por lo cual se decidió estudiar si eran capaces de inhibir el crecimiento de un tumor derivado de dicha línea celular *in vivo*.**

Sebti y col (**Sebti y col., 1991**) lograron inhibir el crecimiento de un tumor derivado de células H-ras transformadas implantadas en ratones nude, utilizando 50 mg/kg. de simvastatin administrado intraperitonealmente. En las condiciones ensayadas en este trabajo, en cambio, la administración oral de 50 mg/kg. de peso/día de simvastatin durante 50 días, no logró inhibir el crecimiento del tumor derivado de la línea celular A549 en ratones nude.

El simvastatin no modificó el contenido de colesterol sérico en los animales tratados, manteniéndose la hipercolesterolemia observada en animales portadores independientemente del tratamiento. Endo y col. (**Endo y col., 1979**) reportaron que la administración de la droga por largos períodos de tiempo no muestra efectos hipocolesterolemiantes en ratas y ratones. Esto podría deberse a la incapacidad de estos animales para catabolizar preferencialmente las lipoproteínas plasmáticas en el hígado.

El simvastatin tampoco ocasionó cambios en el contenido de colesterol hepático en los animales tratados.

Sobre la base de los resultados obtenidos el simvastatin parece no tener efecto alguno sobre el animal sometido a tratamiento, ni sobre el tumor. Esto podría deberse a una administración o a una dosis inadecuadas, lo cual no permitiría que el simvastatin alcance los tejidos blanco.

Con respecto al efecto del geraniol y, a pesar de que otros autores (**Yu y col., 1995**) lograron suprimir el crecimiento tumoral del hepatoma de Morris 7777 y del melanoma B16 utilizando concentraciones de geraniol similares a las utilizadas en este experimento, en nuestras condiciones experimentales no se obtuvieron resultados similares. El tratamiento previo con geraniol no modificó el porcentaje de toma ni el crecimiento tumoral, a diferencia de los resultados obtenidos por estos autores.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, el geraniol, a diferencia del simvastatin, sí ocasiona cambios en el contenido de colesterol plasmático y hepático. Esos cambios parecen ser modificados por la presencia del tumor (tabla IV.5.), aunque se desconoce el mecanismo por el cual causa este efecto.



# CAPITULO V

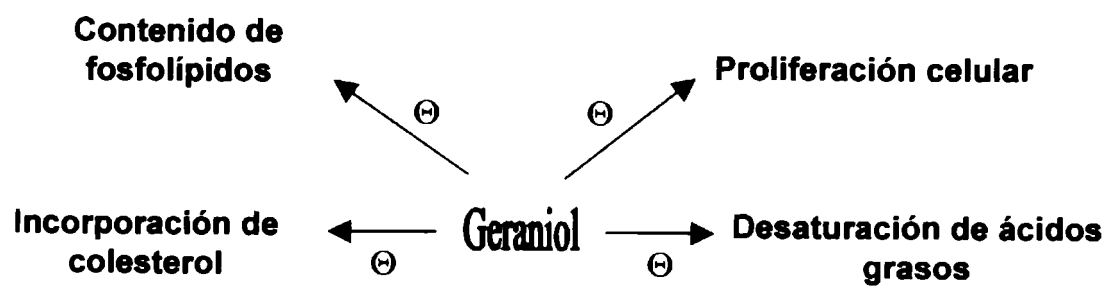
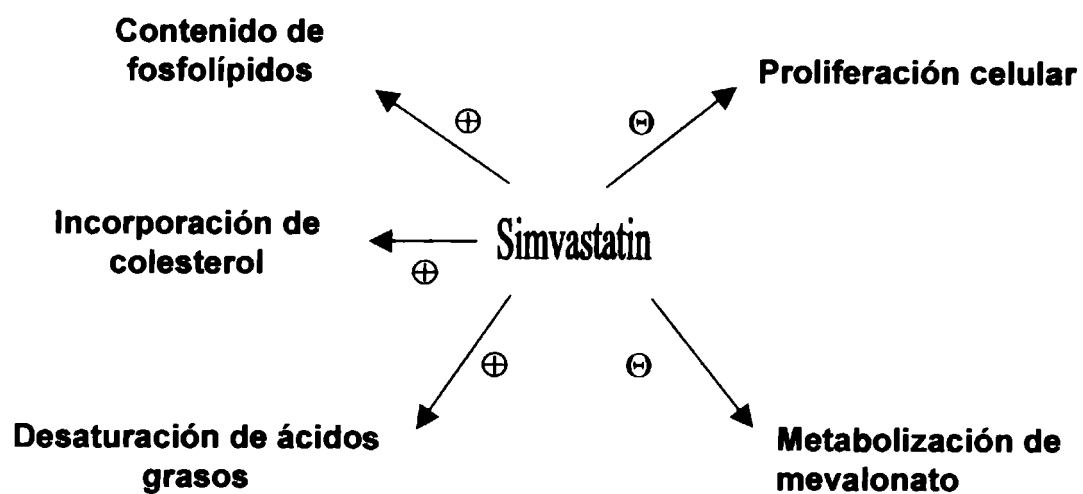
*CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo son las siguientes:

- ✓ El simvastatin (90  $\mu\text{M}$ ) y el geraniol (600  $\mu\text{M}$ ) ocasionan una disminución de la proliferación de las células A549 luego de 48 horas de tratamiento.
- ✓ Tanto el simvastatin como el geraniol afectan el metabolismo lipídico de las células en cultivo, aunque ambos inhibidores ejercen su acción mediante distintos mecanismos.
- ✓ El simvastatin no ocasiona cambios en el contenido de colesterol celular. Esto se debería a un aumento en la captación de colesterol desde el medio. El geraniol, en cambio, causa una disminución del contenido de colesterol celular, lo cual se debería no sólo a una disminución de la síntesis endógena por inhibición de la HMG-CoA reductasa, sino a una disminución de la captación exógena, mediada por un mecanismo desconocido.
- ✓ El tratamiento con simvastatin aumenta el contenido de fosfolípidos celulares. Esto estaría de acuerdo con un aumento de la síntesis de membranas internas que acompañaría a la inducción de la reductasa causada por esta sustancia, así como también a un aumento de la síntesis de las enzimas detoxificantes del sistema P450.
- ✓ El geraniol ocasiona una disminución en el contenido de fosfolípidos, lo cual se debería a una inhibición de la síntesis de estos lípidos por un mecanismo independiente de la regulación vía SREBPs.
- ✓ Las células A549 presentan elevada actividad de las enzimas involucradas en la desaturación de ácidos grasos ( $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 9$  desaturasas).

- ✓ El tratamiento con simvastatin ocasiona un aumento de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa
- ✓ La actividad  $\Delta 9$  desaturasa y/o la actividad de las enzimas elongantes estarían aumentadas en las células tratadas con simvastatin. Este efecto podría deberse a un aumento de las enzimas causadas por SREBP como consecuencia del tratamiento.
- ✓ El simvastatin modifica la desaturación de ácidos grasos suplementados en forma exógena y de ácidos grasos formados a partir de precursores endógenos.
- ✓ El geraniol ocasiona una disminución en el contenido de 16:1 n-7 y de 18:1 n-9 y del 18:3 n-6, la cual podría deberse a una disminución en las actividades de la  $\Delta 9$  y  $\Delta 6$  desaturasa.
- ✓ La presencia de geraniol causa una disminución de la actividad  $\Delta 5$  desaturasa.
- ✓ La disminución de la incorporación de mevalonato exógeno en lípidos insaponificables indica que el simvastatin afectaría alguna enzima involucrada en la síntesis de esteroides distinta a la reductasa.
- ✓ En presencia de simvastatin, el mevalonato exógeno es incorporado preferencialmente en proteínas. Esto confirmaría que el mevalonato es requerido para la síntesis de proteínas isopreniladas, necesarias para la proliferación celular. Además reafirmaría que las células A549 presentan una síntesis de productos no esteroides mayor respecto a la de productos no esteroides.
- ✓ El simvastatin, entonces, afectaría la metabolización de mevalonato independientemente de su efecto inhibitorio sobre la reductasa.



En estos esquemas se resumen los principales efectos ocasionados por el tratamiento con simvastatin (90  $\mu\text{M}$ ) y geraniol (600  $\mu\text{M}$ ) sobre la proliferación y el metabolismo lipídico de las células A549.

- ✓ El modelo de tumor A549/ ratones inmunodeficientes NIH nude presenta diferencias en la composición lipídica respecto a la línea celular de origen, lo cual indicaría una diferenciación de las células al ser implantadas en el huésped.
- ✓ La presencia del tumor afecta notoriamente el metabolismo lipídico del hígado del animal portador. El tumor parece disminuir la captación de las LDL plasmáticas y la catabolización del colesterol en hígado.
- ✓ La metabolización del mevalonato se encontraría afectada en todos los tejidos estudiados. Principalmente en hígado, el tumor estaría inhibiendo la síntesis de esteroides a partir de mevalonato.
- ✓ El tumor disminuye la actividad  $\Delta 5$  desaturasa del hígado huésped sin afectar, aparentemente la actividad  $\Delta 6$  desaturasa ni la composición de ácidos grasos de fosfolípidos hepáticos o plasmáticos.
- ✓ El simvastatin y el geraniol no afectan el crecimiento tumoral en las condiciones experimentales ensayadas.
- ✓ El simvastatin no parece modificar el metabolismo lipídico del huésped. El geraniol, en cambio, ocasionaría cambios en este metabolismo, que parecen estar potenciados por la presencia del tumor.

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. (1979). *Nature* 282:615-616
- Aguilera J.A., Linares A., Arce V., Garcia-Peregrin E. (1983). Incorporation of mevalonate into squalene, lanosterol and cholesterol by different neonatal chick tissues. *Int J Biochem* 15:1481-4.
- Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez J., Joshua H., Harris E., Pachett A., Monaghan R., Currie S., Dtapeley E., Albers-Schonberg G., Hensen O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J., and Springer, J. (1980). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 77:3957-3961.
- Albino L., Polo M.P., G. de Bravo. T. de Alaniz M.J. (2001). Uptake and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in Hep2 human larynx tumor cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 65:295-300.
- Ayté J., Gil-Gómez G., Haro D., Marrero P.F. and Hegart F.G. (1990). *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 87:3874-3778.
- Bardon S, Foussard V, Fournel S, Loubat A. (2002). Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett.* 26;181(2):187-94
- Bellini M.J., Polo M.P., T. de Alaniz, G. de Bravo M. (2003). Effect of simvastatin on the uptake and metabolic conversion of palmitic, dihomo- $\gamma$ -linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids in A549 cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 69(5):351-7.
- Bennis F., Favre G., Le Gaillard F. and Soula G. (1993). Importance of mevalonate derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int.J.Cancer.* 55:640-645.
- Beytia E.D and Porter J.W. (1976). *Biochemistry of polyisoprenoids biosynthesis.* *Ann. Rev. Biochemistry.*45:113-142.
- Bloch K. (1954). Biological synthesis of cholesterol, in: *The Harvey Lectures*, Academic Press, New York, 48:68-88.
- Bloch K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science.* 150:19-28
- Bodake H.B., Panicker K.N., Kailaje V.V., Rao K.V. (2003). Chemopreventive effect of orange oil on the development of hepatic preneoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats: an ultrastructural study. *Indian J Exp Biol.* 40(3):245-51.
- Boney C., Fiedorek.F.T.Jr., Paul S.R., Gruppuso P.A. (1996). Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3 -L1 cell differentiation. *Endocrinology* 137:2923-2928.
- Brenner RR. (1987). Polyunsaturated fatty acid and its regulation. In: *Recent advances in essential fatty acid research.* U.N.Das, editor. Vol.1 pp 5-18. Academic publications. India.
- Brenner R.R. (2003). Hormonal modulation of  $\Delta$ 6 and  $\Delta$ 5 desaturases: case of diabetes, *Prostaglandins, Leukot.Essent.Fatty Acids* 68:151-162.

- Brenner, R.R., and Peluffo, R.O. Effect of saturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. (1966). *J. Biol. Chem* 241:5213-5219
- Brown A.G., Smale T.C., King T.J., Hasenkam P., and Thompson R.H. (1976). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*:1165-1170.
- Brown D.A. and Simoni R.D (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:1974-1678.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (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 M.S. and Goldstein J.L. (1980a). Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoids synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21:505-517.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1980b). *J. Biol. Chem* 258:505-517.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1986). *Science*. 232:34-47.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1997). *Cell* 89:331-340.
- Buchwald H. (1992). Cholesterol inhibition, cancer, and chemotherapy. *Lancet*. 339(8802):1154-6
- Burke Y.D., Stark M.J., Roach S.L., Sen S.E., and Crowell P.L. (1997). Inhibition of pancreatic cancer growth by dietary isoprenoids farnesol and Geraniol. *Lipids* 32:151-156
- Calviello G., Palozza P., Poccioni E., Maggiano N., Frattucci A., Franceschelli P., Bartoli G. M. (1998). Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer*. 75:699-705
- Catalá, A., Nervi, A.M., and Brenner, R.R. Separation of a Protein-Factor Necessary for Oxidative Desaturation of Fatty Acids in Rat. (1975). *J. Biol. Chem.* 250:7481-7484.
- Cerda S.R., Wilkinson IV. J., Branch S.K., Broitman S.A. (1999). Enhancement of sterol synthesis by monoterpene perillyl alcohol is unaffected by competitive 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase inhibition. *Lipids*. 34(6) :605-615.
- Chan K.K., Oza A.M., Siu L.L. (2003). The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res.* 9(1):10-9.
- Chen H.W., Kandutsch A.A., and Waymouth C. (1974). *Nature* 251:419-421.
- Chen H.W., Heninger H.J., and Kandutsch A.A. (1975). Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72:1950-1954.
- Chen P.S., Toribara, T., and Warner, H. (1956). Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 28:1756-1758.

- Clegg R.J., Middleton B., Bell G.D., and White D.A. (1980). Inhibition of hepatic cholesterol synthesis and S-3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by mono and bicyclic monoterpenes administered in vivo. *Biochem.Pharmacol.* 29:2125-2127.
- Clegg R.J., Middleton B., Bell G.D., and White D.A. (1982). The mechanism of cyclic monoterpene inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vivo in the rat. *J.Biol.Chem.* 257:2294-2299.
- Coleman P.S. and Laviets B.B. (1981). Membrane cholesterol and tumorigenesis *C.R.C. Crit.Rev.Biochem.* 11:341-393.
- Columbano A., Dessi S., Ledda-Columbano G.M., Chiodino C., Coni P., Pani P. and Rao K.N. (1987). HMP-shunt and cholesterol metabolism in experimental models involving normal and preneoplastic liver growth. *Toxicologic. Pathol.* 15:43-50
- Connor W.E., Neuringer M. (1988). The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina. *Prog Clin Biol Res.* 282:275-94.
- Cooper, T.G. In: "Instrumentos y técnicas en Bioquímica" (1984). (De Reverté) Cap.III, pág. 103.
- Cornell R., Grove G.L., Rothblat G.H., and Horwitz, A.F. (1977). Lipid requirement for cell cycling. *Exp.Cell.Res.* 109:199-307.
- Correl C.C, Edwards P.A. (1994). *J.Biol.Chem.* 269:17390-93
- Corton J.M., Gillispie J.G. and Hardie, D.G. (1994) *Curr.Biol.* 4:315-324
- Crick D.C., Andres D.A., Danesi R., Macchia M., Waechter, J. (1998). *Neurochem.* 70:2397-2405.
- Crowell P.L. (1997). Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat.* 46(2-3):191-7.
- Crowell P.L., Lin S., Vedejs E., and Gould M.N. (1992). Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31:205-212.
- Crowell P.L., Elegbede J.A., Elson C.E., Lin S., Bailey H.H., Vedejs E., and Gould M.N. (1994). Human metabolism of the antitumor agent d-limonene *Cancer Chemother.Pharmacol.* 35:31-37.
- Cuthbert and Lipsky (1991) Negative regulation of cell proliferation by mevalonate or one of the mevalonate phosphates. *J Biol Chem.* 66 (27): 17966.
- Davingnon J., Laaksonen R. (1999). Low-density lipoprotein-independent effects of statins *Curr Opin Lipidol.* 10 (6):543-559.
- de Antueno R.J., Niedfeld G., De Tomás M.E., Mercuri O.F., Quintans C. (1987). Tumors lipids and lipids metabolism in the model human lung carcinoma/nude mice. *Biochem. Int* 14:1097-1103



- de Bravo M.G., Schinella G., Polo M.P., Tournier H. (1996). Effects of lovastatin on the fatty acid desaturation in human lung mucoepidermoid carcinoma grown in nude mice. *Biochemistry and molecular Biology International*. 38 (5):929-935.
- Dietschy J.M. and Siperstein M.D. (1967). Effect of feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J Lipid Res* 8:97-104
- Dunbar L.M., Bailey J.M. (1975). Enzyme deletion and essential fatty acid metabolism in cultured cells. *J Biol Chem* . 250: 1152-1153
- Edwards P.A., Ericsson J. (1999). Sterols and isoprenoids. *Annu.Rev.Biochem.* 68:157-185.
- Edwards P.A. and Davies R. (1996). Isoprenoids, sterol and bile acids. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and Membranes*, Cap.13.
- Elmberger P.G, Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G. (1987). In vitro and in vivo synthesis of dolichol and other main mevalonate products in various organs of the rat. *Eur J Biochem.* 168(1):1-11.
- Elson C.E., and Yu S.G. (1994). The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.* 124:607-614.
- Elson CE, Peffley DM, Hentosh P, Mo H. (1999). Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Biol Med.* 221(4):294-311.
- Endo A. (1979). *J.Antibiot.* 32:852-854.
- Endo A. (1980). *J.Antibiot.* 33:334-336.
- Endo A. (1988). Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin Wochenschr.* 66 (10):421-7.
- Endo A., Kuroda M., and Tanazawa W. (1976a). *FEBS Lett.* 72:323-326.
- Endo A., Kuroda M., and Tsujita Y. (1976b) *J.Antibiot.* 29:1346-1348.
- Erickson S.K., Cooper A.D., Barnard G.F., Havel C.M., Watson J.A., Feingold K.R., Moser A.H., Hughes-Fulford M. and Siperstein M.D. (1988). Regulation of cholesterol metabolism in a slow-growing hepatoma in vivo. *Biochim.Biophys.Acta.* 960:131-138.
- Ferri N., Arnaboldi L., Orlandi A., Yokoyama K., Gree R., Granata A., Hachem A., Paoletti R., Gelb M.H., Corsini A. (2001). Effect of S(-) perillidic acid on protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. *Biochem Pharmacol.* 15:62(12):1637-45
- Flagan, S.P. (1966). *Genet.Res. (Camb.)* 8:295-309.
- Folch J., Lees M., and Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J.Biol.Chem.* 226:497-509.
- Galli C., Marangoni F. (1997). Recent advances in the biology of n-6 fatty acids. *Nutrition.* 13 (11-12):978-85.

- Galli C., Rise P., Marangoni F., Petroni A., Visioli F. (1997). Manipulation of the fate of long chain polyunsaturated fatty acids in cultured cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 57(1):23-6.
- Garda H.A., Leikin A.I., and Brenner R.R. (1992) *An.Asoc.Quim.Argent.* 80 (4) :365-371.
- Gelb M.H., Scholten J.D. and Sebolt-Leopold J.S. (1998). Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2:40-48
- Georges B., Blond J.P., Manlongui C., Bézard J. (1993). Effect of simvastatin on desaturase activities in liver from lean and obese zucker rats. *Lipids*; 28: 63-65.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973), In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J.nat..Cancer Inst.* 51:1417-1423.
- Gillispie J.G. and Hardie D.G. (1992). *FEBS Lett.* 306:59-62.
- Goldstein J.L. and Brown M. S. (1974). Binding and degradation of low-density lipoprotein receptor pathway in cultured human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 249:5153-5162.
- Goldstein J.L. and Brown M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343:425-430.
- Goldstein J.L., Helgeson J.A.S., and Brown M.S. (1979). Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low-density lipoprotein receptor. *J.Biol.Chem* 254:5403-5409.
- Goldstein J.L., Rawson R.B, Brown M.S. (2002). *Arch.Biochem.Biophys.* 397,139.
- González S., Nervi A.M., Peluffo R.O., Brenner R.R. (1983). Effect of enviromental temperature changes on rat liver fatty acid deaturases. *Lipids* 18:7-11.
- Gough D.P and Hemming F.W. (1970). The characterization and stereochemistry of biosynthesis of dolichols in rat liver. *Bochem.J.*118:163-166.
- Green JR, Clezardin P. (2002). Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am.J.Clin.Oncol.* 25(6 Suppl 1):S3-9.
- Guan G., Dai P., Schechter I. (1998). *J.Biol.Chem.* 273:12526-12535.
- Habenicht A.J.R., Glomset J.A., and Ross R. (1980) Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 255:5134-5140.
- Haeffner E.W., Hoffmann C.J.K., Stoehr M., and Scherf H. (1984) *Cancer Res.* 44:2668-2676.
- Hanahan D.J., Dittnar J.C., and Warashima E. A. (1957). Column Chromatographic Separation of Classes of Phospholipids. *J.Biol.Chem.* 228:685-690.
- Hancock J.F., Magee A.I., Childs J.E., and Marshal C.J. (1989). *Cell* 57:1167-1177.

- Havel R.J., Hunninghake D.B., Illingworth D.R., Lees R.S., Stein E.A., Tolbert J.A., Bacon S.R., Bolognese J.A., Frost P.H., Lamkin G.E., Lees A.M., Leon A.S., Gardner K., Johnson G., Mellies M.J., Rhymer P.A., and Tun P. (1987). *Ann.Intern.Med.* 107:609-615.
- Hawk M.A., Cesen K.T., Siglin J.C., Stoner G.D., Ruch R.J. (1996). Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Letters* 109:217-222.
- He L., Mo H., Hadisusilo S., Qureshi A.A., Elson C.E. (1997). Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *J Nutr.* 1997 May;127(5):668-74.
- Hentosh P., Yuh S.H., Elson C.E. and Peffley D.M. (2001). Sterol independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in tumor cells. *Mol.Carcinog.* 32:154-166.
- Hoeg J.M. and Brewer H.B. (1987). *J.Am.Med.Assoc.* 258:3532-3536.
- Holstein S.A, Hohl R.J. (2003). Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *J Lipid Res.* 44(6):1209-15
- Horton J.D., Goldstein J.L., Broen M.S. (2002). SREBPs: activators of a complete program of cholesterol and fatty acids synthesis in the liver. *Journal of Clin.Inv.* 109 (9):1125-1131..
- Houchens, D.P., Ovejera, A.A., and Baker, A.D. (1978). In: "The Use of Atimic Nude Mice in Cancer Research (Houchens, D.P., and Ovejera, A.A., eds.) pp.267-289, G.Fischer, Stuttgart.
- Igimi H., Nishimura M., Kodama R., and Ide H. (1974). Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene).I. The absorption, distribution and excretion of d-limonene in rats. *Xenobiotica.* 4:77-84.
- Illingworth D.R. and Sexton G.J. (1984). *J.Clin.Invest.* 74:1972-1978.
- Jauregui, H.O., Hayner, N.T., Driscoll, J.L., Williams-Holland, R., Lipsky, m.H., and Galletti, P.M. (1981). *In Vitro* 17:1100-1104.
- Jingami H., Brown M.S., Goldstein J.L., Anderson R.G, Luskey K.L. (1987). *J.Cell.Biol.* 104:1693-1704.
- Jones B.H., Maher M.A., Banz W.J., Zemel M.B., Whelan J., Smith P.J., Moustaid-Moussa N. (1996). Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am.J.Physiol.* 271 Pt1. E44-E49.
- Jones B.H., Standridge M.K., Claycombe K.J., Smith P.J., Moustaid-Moussa N. (1998). Glucose induces expression of stearoyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 335:405-408.
- Joyce PL, Cox AD. (2003). Rac1 and rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling.. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7959-67

- Jump D.B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids, *J.Biol.Chem.* 277:8755-58.
- Kandutsch A.A. and Chen H.W. (1977). Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells. *J.Biol.Chem.* 254:409-415.
- Kaneko I., Hazama-Shimada Y., and Endo A. (1978). Inhibitory effects on lipids metabolism in cultured cells of ML-236B, a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Eur.J.Biochem.* 87:313-321.
- Karlson J., Borg-Karlson A.K., Unelius R., Shoshan M.C., Wilking N., Ringborg U., Linder S. (1996). Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anticancer Drugs.* 7(4):422-9
- Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H, Matsuzawa Y. (1994). Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer.* 69(6):1015-20.
- Kersten S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis, *EMBO Rep.* 2:282-286
- Kim J.B., Speigelman B.M. (1996). *Genes Dev.* 10:1096-1107.
- Kis M., Zsiros O., Farkas T., Wada H., Nagy F., Gombos Z. (1998). Light-induced expression of fatty acid desaturase genes, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 95:4209-4214.
- Kodama R., Noda K., and Ide H. (1976a). Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene).II. The metabolic fate of d-limonene in rabbits. *Xenobiotica.* 4:85-95.
- Kodama R., Yano T., Furukawa K., Noda K., and Ide H. (1976b). Studies on the metabolism of d-limonene (p-mentha-1,8-diene).IV. Isolation and characterization of new metabolites and species differences in metabolism. *Xenobiotica.* 6:377-389.
- Kotzka J, Muller-Wieland D, Roth G., Kremer L., Munch M., Schurmann S., Knebel B. and Krone W. (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J.Lipid Res.* 41:99-108.
- Landau J.M., Sekowsky A., Hamm M.W. (1997). Dietary cholesterol and the activity of stearoyl CoA desaturase in rats : evidence for an indirect regulatory effect. *Biochem.Biophys.Acta* 1345:349-357.
- Lee T.-J. (1987). *TIPS.* 8:442-446.
- Leikin A.I., Brenner R.R. (1988). In Vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. *Biochim.Biophys.Acta* 963:311-319
- Li J., Ding S.-F., Habbib N.A., Fermor B.F., Wood C.B., Gilmour R.S. (1994). Partial characterization of a cDNA for human stearoyl CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int.J.Cancer* 57:348-352
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. (1976) *Int.J.Cancer* 17:62-70.

- Linares A, Aguilera JA, Arce V, Garcia-Peregrin E. (1983). Studies of the in vivo metabolism of mevalonic acid in the neonatal chick. *Int J Biochem.* 15:1477-80
- Liscum L., Cummings R.D., Anderson R.G.W., de Martino G.N., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1983) *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 80:7165-7169.
- Lowry R.R. (1968). Ferric Chloride Spray Detector for Cholesterol and Cholesterol Esters on Thin-Layer Chromatograms. *J.Lipid Res.* 9:397.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275
- Maltese, W.A., and Aprille, J.R. (1985). Relation of mevalonate synthesis to mitochondrial ubiquinone content and respiratory function in cultured neuroblastoma cells *J.Biol.Chem.* 260:11524-11529
- Maltese, W.A., and Sheridan, K.M. (1985). Differentiation of neuroblastoma cells induced by an inhibitor of mevalonate synthesis: Relation of neurite outgrowth and acetylcholinesterase activity to changes in cell proliferation and blocked isoprenoid synthesis. *J.Cell.Physiol.* 125:540-558.
- Maltese, W.A., and Sheridan, K.M. (1987). Isoprenylated proteins in cultured cells: Subcellular distribution and changes related to altered morphology and growth arrest induced by mevalonate deprivation. *J.Cell.Physiology* 133:471-481.
- Manning, D.D., Reed, N.D., and Shaffer, C.F. (1973). *J.Exp.Med.* 138:448-494.
- Martínez-Botas J., Ferruelo A. J., Suárez Y., Fernández C., Gómez-Coronado D., Lasunción M. A. (2001). Dose dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Bioch. Biophys. Acta.* 1532:185-194.
- McGarvey D. J., and Grotteau R. (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* 7:1015-1026.
- McLaughlin L., Burchell B., Pritchard M., Wolf C. R., Friedberg T. J. (1999). Treatment of mammalian cells with the endoplasmic reticulum-proliferator compactin strongly induces recombinant and endogenous xenobiotic metabolizing enzymes and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in vitro. *Cell Sci;* 112: 515-523.
- Meigs T.E, Roseman D.S, Simoni R.D. (1996). *J.Biol.Chem.* 271:7916-22.
- Mercuri O y De Tomas M.E. ( 1977). Regulation of the delta9 desaturation. *Adv Exp Med Biol.* 83:75-83.
- Miller C.W., Ntambi J.M. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93:9443-9448
- Miyazaki M., Ntambi J.M. (2003). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 68(2):113-21.
- Morrison W.R. and Smith L.M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with Boron Floride-Methanol. *J.Lipid Res.* 5:600-608.

- Nakada T., Kwee I.L., Ellis W.G. (1990). Membrane fatty acid composition shows  $\Delta 6$  abnormalities in Alzheimer's disease. *Clin.Neurosci.Neuropathol.* 1:153-155.
- Nakamura M.T., Cho H.P., Clarke S.D. (2000). Regulation of hepatic delta 6 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice. *J.Nutr.* 130:1561-1565.
- Nakanishi M, Goldstein J.L. and Brown M.S. (1988). *J.Biol.Chem.* 263:8929-37.
- Nervi A.M., Peluffo R.O., Brenner R.R., Leikin A.I. (1980). Effect of ethanol administration on fatty acid desaturation. *Lipids* 15:263-268.
- Nohturfft A., Yabe D., Goldstein J.L., Brown M.S., Espenshade P.J. (2000). *Cell* 102, 315.
- Ntambi J.M. (1992). Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J.Biol.Chem.*267:10925-10930.
- Ntambi J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol, *J.Lipid Res.* 40:1549-1558.
- Ntambi J.M. and Miyazaki M. (2003). Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism *Progress in Lipid Research*, In Press, Corrected Proof, Available online 24 July.
- Ntambi J.M., Buhrow S.A., Kaestner K.H., Christy R.J., Sibley E., Kelly T.J. Jr. (1988) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase, *J. Biol. Chem.* 263:17291-17300.
- Ntambi J.M., Sessler A.M., Takova T. (1996). A model cell line to study regulation of stearoyl-CoA desaturase gene 1 expression by insulin and polyunsaturated fatty acids. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 220:990-995.
- Olson, R.E. (1968). Biosynthesis of ubiquinone in animals. In *vitamins and Hormones*. Harris R.S., Wool I.G. and Loraine J.A., editors. Academic Press, New York. 24:551-574.
- Osborne T.F. (2002). Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *Journal of Biological Chemistry* 245 (42) :32379-32382.
- Pai Jih-tung, Guryev O., Brown M.S., and Goldstein J.L.. (1998). Differential stimulation of cholesterol and fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J.Biol.Chem* 273 :26138-26148.
- Pantelorius, E.M. (1968). *Nature* 217:370-371.
- Parmryd I., Dallner G. (1999). In vivo prenylation of rat proteins: modification of proteins with penta- and hexaprenyl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 364 (2):153-160.
- Patterson, M.K.Jr. (1979). In:"Methods in enzymology". (De Jacoby, W.B., and Pastan, I.H.) Academic Press, New York. Vol.58, pág. 144.

- Peffley, D.M., Gayen, A.K. (2003). Plant derived monoterpenes suppress hamster-kidney cell HMG-CoA reductase synthesis at postranscriptional levels. *J.Nutr.* 133 (58):38-44.
- Pereira S.L., Leonard A.E., Mukerji P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eucaryotes. *Prostaglandins Leukotrienes and essential fatty acids.* 68:97-106.
- Philips L.R., Malpeis L., and Supko J. G. (1995). Pharmacokinetics of active drugs metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. *Drug.Metab.Dispos.* 23:676-680.
- Phillips H.J. (1973). In: "Dye exclusion test for cell viability in tissue cultures". Academic Press., New York. Pág. 406.
- Polo M.P, de Bravo M.G., Carbone C. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in liver of athynic mouse with or without an implanted human carcinoma. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 122:433-437.
- Polo M.P, and de Bravo M.G.. (2001). Simvastatin effects on a human lung carcinoma and cholesterol homeostasis of host and non-host mice. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 109 (5):435-440.
- Polo M.P., Bellini M.J., Bravo M.G de. (2003). Lipid metabolism in HEP G2 cells treated with HMG-CoA reductase inhibitors. *Biocell* 27 (Supplement 1) 152 (Abs.).
- Popjak G. (1971). Specificity of enzymes of sterol biosynthesis. *Harvey Lect.* 65:127-156.
- Popjak G., Cornforth J.W. (1966). Substrate stereochemistry in squalene biosynthesis. *Biochem.J.* 101:553-569.
- Popjak G., De Goodman W.S., Cornforth J.W., Cornforth R.H. and Ryhage R. (1961). Mechanism of squalene biosynthesis from farnesyl pyrophosphate and from mevalonate. *J.Biol.Chem.* 236:1934-1947.
- Quesney-Huneus V.Q., Wiley M. H., and Siperstein M. D. (1979). Essential role of mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 76:5056-5060.
- Quesney-Huneus V.Q., Galick H.A. and Siperstein M., Erickson S.K., Spencer T.A. and Nelson J.A. (1983). The dual role of mevalonate in cell cycle. *J.Biol.Chem.* 258:378-385.
- Qureshi A.A., Mangels W.R., Din Z.Z., and Elson C.E. (1988). Inhibition of hepatic mevalonate synthesis by the monoterpene, d-limonene. *J.Agric.Food.Chem.* 36:1220-1224.
- Rahman SM, Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Ntambi JM. (2003). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(19):11110-5.
- Rao G.A., Lew G., Larkin E.C. (1984). Alcohol ingestion and levels of hepatic fatty acid synthetase and stearyl-CoA desaturase activities in rats. *Lipids.* 19:151-153.

- Rao K.N. (1986). Regulatory aspects of cholesterol metabolism in cells with different degrees of replication. *Toxicologic Pathol.* 14:430-443.
- Rao K.N. (1995). The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis. *Anticancer Research* 15:309-314
- Rao K.N., Kottapally S. and Shinozuka H. (1984). Acinar cell carcinoma of rat pancreas: mechanism of deregulation of cholesterol metabolism. *Toxicologic Pathol.* 12:62-68.
- Rao K.N., Gabriel H.F., Eskander E.D., Melhen M.F. (1988). Lipoprotein, cell proliferation and cancer. In *Chem. Carcinogenesis*. (Eds.) Feo F., Pani P., Columbano A., Garcia R. Plenum Press. pp. 495-503.
- Raphael T.J., Kuttan G. (2003). Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 22(3):419-24.
- Rebuffat P., Belloni A.S., Cavallini L., Mazzocchi G., Meneghelli V., Nussdorfer G.G. (1988). Effect of mevinolin on rat hepatocytes: a morphometric study. *Exp Pathol*; 35:133-139.
- Ren Z., and Gould M.N. (1994). Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol *Cancer Lett.* 76:185-190.
- Repa J.J., Liang G., Ou J., Bashmakov Y., Lobaccaro J.M., Shimomura I. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta, *Gene Dev.* 4:2819-2830
- Richter, A., Sandford, K.K., and Evans, V.J. (1972). *J.Natl.Cancer Inst.* 49:1705-1710.
- Ridgway N.D., Byers D.M., Cook H.W, Storey M.K. (1999). Integration of phospholipid and sterol metabolism in mammalian cells. *Progress in lipid research* 38:337-360.
- Righetti M., Wiley M.H., Murril P.A., Siperstein M.D. (1976). The in vitro metabolism of mevalonate by sterol and non sterol pathway. *J Biol Chem* 251:2716-2721
- Rimoldi O.J., Finarelli G.S, Brenner R.R. (2001). Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 283:795-804.
- Rise P, Colombo C, Galli C. (1997). Effects of simvastatin on the metabolism of polyunsaturated fatty acids and on glycerolipid, cholesterol, and de novo lipid synthesis in THP-1 cells. *J Lipid Res.* 38(7):1299-307.
- Rise P., Marangoni F., Galli C. (2002). Regulation of PUFA metabolism: pharmacological and toxicological aspects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 67(2-3):85-9.
- Rise P., Ghezzi S., Levati M.G., Mirtini R., Colombo C., Galli C. (2003). Pharmacological modulation of fatty acid desaturation and of cholesterol biosynthesis in THP-1 cells. *Lipids.* 38(8):841-6.



- Russell D.W. and Setchell D.R. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31:4737-4749).
- Rygaard, J. (1969). *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 77:761-762
- Rygaard, J., and Polvsen, C.O. (1969) *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 77:758-760
- Schafer WR, Kim R, Sterne R, Thorner J, Kim SH, Rine J. (1989). *Science* 245:379-385.
- Schmidt, R.A., Schneider, C.J., and Glomset, J.A. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. (1984). *J.Biol.Chem.* 259:10175-10180.
- Sebti, S.M., Tkalcevic, G.T., and Jani, J.P. (1991). *Cancer Comm.* 3:141-147.
- Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. (2003). Statins can inhibit proliferation of human breast cancer cells in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 111(1):47-8.
- Sepp-Lorenzino L., Rao S., Coleman P.S. (1991). Cell-Cycle-dependent, differential prenylation of proteins *J. Biochem.* 200:579-90.
- Sever N., Yang T., Brown M.S., Goldstein J.L. and DeBose-Boyd R.A. (2003). Accelerated Degradation of HMG CoA Reductase Mediated by Binding of Insig-1 to Its Sterol-Sensing Domain. *Molecular cell.* 11 (1):25-33.
- Shimano H., Horton J.D., Shimomura I., Hammer R.E, Brown M.S., Goldstein J.L. (1997). *J.Clin.Invest.* 99:846-854.
- Sinensky M. (2000). Recent advances in the study of prenylated proteins. *Biochem.Biophys.Acta* 1484:93-106.
- Singh R.P., Dhawan P., Golden C., Kapoor G.S and Mehta K.D. (1999). One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44 (MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces LDL receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. *J.Biol.Chem.* 274:19593-19600.
- Singh R.P., Kumar R., Kapur N. (2003). Molecular regulation of cholesterol biosynthesis: implications in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 22(2):75-92.
- Siperstein M.D. (1984). Role of cholesterologenesis and isoprenoids synthesis in DNA replication and cell growth. *Journal of Lipids Research.* 25:1462-1467.
- Siperstein M.D. and Fagan V.M. (1964a). Deletion of the cholesterol negative feedback system in liver tumors. *Cancer Res.* 24:1108-1115
- Siperstein M.D. and Fagan V.M. (1964b). Studies of the feedback regulation of cholesterol synthesis. *Adv.Enzyme Regul.* 2:249-264.
- Soma MR, Corsini A, Paoletti R. (1992). Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol Lett.* 64-65 Spec No:1-15.
- Spady D.K., Bilheimer D.W., and Dietschy J.M. (1983). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 80:3499-3503.

- Spector, A.A., Steinberg, R.R., Tanaka, A. (1965). Uptake of free fatty acids by Erlich ascites tumor cells. *J.Biol.Chem.* 240:1032-1041.
- Srere, P.A., Chaikoff, I.L., Dauben, W.C. (1948). The in vitro synthesis of cholesterol from acetate by surviving adrenal cortical tissue. *J.Biol Chem.* 176:829-833.
- Storlazzi A., Maresca B., Gargano S. (1999). cAMP is involved in transcriptional regulation of delta9-desaturase during *Histoplasma capsulatum* morphogenesis. *Mol.Cell Biol.Re.Comm.* 2:172-177
- T.de Alaniz M.J., Marra C.A. (2003). Steroid hormones and fatty acids desaturases Prostaglandins, *Leukot.Essent.Fatty Acids* 68:163-170
- Takai Y., Sasaki T., and Matozaki T. (2001). Small GTP-binding proteins *Physiological. Review.* 81:153-208.
- Tatman D, Mo H. (2002). Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett.* 175(2):129-39.
- The Lovastatin Study Group II. (1986). *J.Med.Assoc.* 256:2829-2834.
- Thewke D.P., Panini S.R., Sinensky M. (1998). *J.Biol Chem.* 273:21402-7.
- Tiku P.E., Gracey A.Y., Macartney A.I., Beynon R.J., Cossins A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanism. *Science.* 271:815-818.
- Tolbert J.A., Bell G.D., Birtwell J., James Y., Kukovetz W.R., Pryor J.S., Buntinx A., Holmes I.B., Choa Y.-S., and Bolognese J.A. (1982). *J.Clin.Invest.* 69:913-919.
- Tsujita Y., Kuroda M., Shimada Y., Tanzawa K., Arai M., Kaneko Y., Tanaka M., Masuda H., Tarumi C., Watanabe Y., and Fuji, S. (1986). *Biochem.Bophys.Acta.* 877:50-60/
- Vogt A., Qian Y., McGuire T.F., Hamilton A.D., Sebti S.M. (1996). *Oncogene.* 13:1991-1999.
- Wanson, J.C. (1976). In: "Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies". (De Tager, J.M., Soling, H.D., Williamson, J.R.). *Amer.Els.Publ.Comp.*, New York. Pág.185
- Waters K.M., Mille C.W., Ntambi J.M. (1997) Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearyl-CoA desaturase gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 233:838-843
- Waters K.M., Ntambi J.M. (1994) Insulin and dietary fructose induce stearyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J.Biol.Chem.* 269:27773-27777.
- Weigand, K. (1976). (De Tager, J.M., Soling, H.D., Williamson, J.R.) *Amer.Els.Publ.Comp.*, New York. Pág.185
- Weinberger C. (1996). *TEM.* 7(1):1-5.

Weiner F.R., Smith P.J., Wertheimer S., Rubin C.S. (1991). Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J.Biol.Chem.* 266:23525-23528.

Wierzbicki A.S., Poston R., Ferro A. (2003). The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacology and therapeutics.* 99:95-112

Witte L.D., Cornicelli J.A., Miller R.W., and Goodman D.S. (1982). Effects of platelet-derived and endothelial cell-derived growth factors on low-density lipoprotein receptor pathway in cultured human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 257:5392-5401.

Worcester N.A., Bruckdorfer K.R., Hallinan T., Wiljins A.J., Mann J.A., Yudkins J. (1979). The influence of diet and diabetes on stearoyl coenzyme a desaturase (EC 1.14.99.5) activity and fatty acid composition in rat tissues. *Br.J.Nutr.* 41:239-252.

Worgall T.S., Sturley S.L., Seo T., Osborne T.F, Deckelbaum R.J. (1998). *J.Biol.Chem.* 273:25537-40.

Yamamoto A., Sudo H., and Endo A. (1980). *Atherosclerosis.* 35:259-266.

Yu S.G., Hildebrandt L.A., and Elson C. (1995). Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J.Nutr.* 125(11):2763-2767.