



Facultad de Ciencias Médicas

UNLP

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN EN LA
INTERACCIÓN ENTRE ESTATINAS Y MONOTERPENOS
EN ANIMALES INMUNODEFICIENTES PORTADORES Y
NO PORTADORES DE TUMORES DE ORIGEN HUMANO

Tesista: Marianela Galle

Director: Dra. Margarita García de Bravo

Co-Director: Dra. Rosana Crespo

La Plata, 2013

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-UNLP-CONICET CCT La Plata) y a la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP y su Cátedra de Biología por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de este trabajo.

Al sostén económico de becas y subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) que me permitieron el desarrollo de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis representa un logro y crecimiento personal de gran importancia en el que tuve la suerte contar con la compañía y la contención de muchas personas, por lo que me resulta imprescindible agradecer a todos aquellos que hicieron de estos años una muy linda experiencia.

A Margarita por darme la posibilidad de embarcarme en este proyecto, por su apoyo, su comprensión y por las enseñanzas brindadas tanto en lo laboral como en lo personal, por ser mamá Maggie.

A Rosana por haberme acompañado en todas y cada una de mis experiencias en el laboratorio, por la paciencia, la confianza y por la peculiar y divertida relación entablada que me permitió trabajar tan a gusto y cómodamente.

A mis compañeros del laboratorio en quienes encontré grandes personas y grandes amigos.

A los Anicitos y a los Betinos por las juntadas, los días de Antares y todos los gratos momentos compartidos.

A Margarita Salas y a Gaby Finarelli por la buena predisposición y colaboración.

A todos los integrantes del INIBIOLP, especialmente a los del cuarto piso, y a mis compañeros de la cátedra de Biología por acompañarme cálidamente en el día a día.

A mis amigas por estar siempre.

A mis papás porque gracias a ellos hoy tengo la posibilidad de estar terminando esta tesis y porque les debo todo lo que soy.

A mis hermanos por ser quienes caminaron siempre a mi lado, porque son hermanos, amigos, niños y compañeros de proyectos. Por darme la oportunidad de ser tía y disfrutar de Juana y Pedro como si fueran mis hijos.

A Nico por elegirme y permitirme crecer a su lado, por acompañarme, entenderme y cuidarme, por construir una familia conmigo.

A Rafa por haber cambiado mi manera de ver las cosas, por ser mi cable a tierra y por alegrarme todos los días.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	VI
Capítulo I. Introducción	
I.1. VÍA DEL MEVALONATO: GENERALIDADES	1
I.2. VÍA DEL MEVALONATO: REGULACIÓN	5
I.3. METABOLISMO DEL COLESTEROL	8
I.4. VÍA DEL MEVALONATO Y CÁNCER	12
I.5. ESTATINAS	16
I.6. MONOTERPENOS: GERANIOL	17
I.7. HIPÓTESIS DE TRABAJO	20
I.8. OBJETIVOS	20
Capítulo II. Materiales y Métodos	
II.1 REACTIVOS	21
II. 2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA UTILIZADA EN ANIMALES	21
II.2.1. Mantenimiento de los animales	21
II. 2.2. Desarrollo y mantenimiento del tumor de la línea de adenocarcinoma de pulmón (A549) en ratones "nude"	22
II.2.3. Medida de las dimensiones tumorales	24
II.2.4. Obtención de la sal sódica de simvastatina	25
II.2.5. Preparado del alimento suplementado con geraniol	26
II.3 METODOLOGÍA ESPECÍFICA DE LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS EVALUADOS	25
II.3.1. Obtención de lípidos totales y separación de lípidos neutros por cromatografía en capa fina	25

II.3.2.	Cuantificación de triglicéridos	27
II.3.3.	Obtención y separación de lípidos insaponificables y ácidos grasos totales	28
II.3.4.	Incorporación de acetato en lípidos totales, lípidos insaponificables y ácidos grasos	29
II.3.5.	Obtención de suero	29
II.3.6.	Determinación de colesterol sérico	29
II.3.7.	Determinación de trigliceridemia	30
II.3.8.	Cuantificación de geraniol en sangre de ratones tratados por cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas	30
II.4.	METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD DE HMGCR	31
II.4.1.	Obtención de microsomas de hígado	31
II.4.2.	Ensayo de actividad de HMGCR	32
II.5.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	33
II.5.1.	Procesamiento de tejidos para cuantificar HMGCR y SREBP-2	33
II.5.2.	Cuantificación de proteínas	35
II.5.2.a.	Método de Lowry	35
II.5.2.b.	Método de Bradford	36
II.5.3.	Determinación de HMGCR y SREBP-2 por western blot	36
II.5.3.a.	Electroforesis	35
II.5.3.b.	Transferencia semi-seca	37
II.5.3.c.	Bloqueo e incubación con anticuerpo	37
II.5.3.d.	Revelado	38
II.5.4.	Aislamiento de membrana plasmática tumoral	38
II.5.5.	Determinación de Ras total y en membrana plasmática	38

II.6.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA	39
II.7.	METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA CUANTIFICAR ARNm POR REAL TIME RT-PCR	40
II.7.1.	Obtención de ARN	40
II.7.2.	Obtención de ADN complementario. Transcripción reversa	41
II.7.3.	Diseño de los cebadores	41
II.7.4.	Chequeo de retrotranscripción y de amplicones	42
II.7.5.	Amplificación en tiempo real del ADN complementario	43
II.8.	METODOLOGÍA PARA DETERMINAR APOPTOSIS TUMORAL	44
II.8.1.	Obtención de los cortes de tejido tumoral	44
II.8.2.	Determinación de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL	44
II.8.3.	Determinación de la actividad de Caspasa-3	45
II.9.	PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
II.10.	BIOÉTICA	46

Capítulo III. Efecto del Geraniol sobre el metabolismo lipídico

III.1.	DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS	47
III.2.	RESULTADOS	48
III.2.1.	Dosis de geraniol ingerida	48
III.2.2.	Toxicidad del geraniol	48
III.2.3.	Concentración de geraniol en sangre	49
III.2.4.	Colesterol y triglicéridos plasmáticos	50
III.2.5.	Colesterol libre, colesterol esterificado y triglicéridos hepáticos	51

III.2.6.	Incorporación de [¹⁴ C]acetato	51
III.2.7.	Efecto del geraniol sobre la HMGCR de hígado de ratón	53
III.2.8.	Expresión del receptor de LDL y de SREBP-2	56
III.3.	DISCUSIÓN	57

Capítulo IV. Efecto del geraniol sobre el crecimiento tumoral

IV.1.	DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS	61
IV.2.	RESULTADOS	62
IV.2.1.	Crecimiento tumoral	62
IV.2.2.	Toxicidad del geraniol	63
IV.2.3.	Apoptosis	63
IV.2.4.	Determinación de Ras	66
IV.2.5.	Metabolismo lipídico en animales con tumor tratados con geraniol	68
IV.2.6.	Niveles de HMGCR y SREBP-2	70
IV.3.	DISCUSIÓN	72

Capítulo V. Efecto de la simvastatina sobre el metabolismo del colesterol y el crecimiento tumoral

V.1.	DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS	77
V.2.	RESULTADOS	78
V.2.1.	Dosis y toxicidad	78
V.2.2.	Crecimiento tumoral	78
V.2.3.	Apoptosis tumoral	79
V.2.4.	Determinación de Ras	81

V.2.5.	Metabolismo lipídico en animales con tumor tratados con simvastatina	82
--------	--	----

V.3.	DISCUSIÓN	84
------	-----------	----

Capítulo VI. Efecto de la combinación de simvastatina y geraniol sobre el metabolismo lipídico y el crecimiento tumoral

VI.1.	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO REALIZADOS	88
-------	--	----

VI.2.	RESULTADOS	89
-------	------------	----

VI.2.1.	Toxicidad	89
---------	-----------	----

VI.2.2.	Crecimiento tumoral	89
---------	---------------------	----

VI.2.3.	Apoptosis tumoral	91
---------	-------------------	----

VI.2.4.	Determinación de Ras	92
---------	----------------------	----

VI.2.5	Metabolismo lipídico en animales con tumor tratados con simvastatina y/o geraniol	93
--------	---	----

VI.3.	DISCUSIÓN	96
-------	-----------	----

Capítulo VII. Conclusiones

VII.1.	CONCLUSIONES	100
--------	--------------	-----

Capítulo VIII. Bibliografía

VIII.1.	BIBLIOGRAFÍA	102
---------	--------------	-----

Abreviaturas:

4-AF: 4-amino-fenazona

AA-CoA: acetoacetil coenzima A

Ac-DEVD-pNA: acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilina

ADNc: ADN complementario

AG: ácidos grasos

ASB: albúmina sérica bovina

C: Cisteína

CE: colesterol esterificado

CHE: colesterol esterasa

CHOD: colesterol oxidasa

CL: colesterol libre

FPP: farnesil pirofosfato

FPTasa: farnesiltransferasa

G: geraniol

GGPP: geranilgeranil-pirofosfato

GGPTasa: geranilgeraniltransferasa

GK: glicerol kinasa

GPO: glicerol fosfato oxidasa

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

ICMT: *isoprenylcysteine carboxymethyltransferase*

IPP: isopentenil pirofosfato

LDL: lipoproteína de baja densidad

LDLR: receptor de LDL

LL: lipoproteín lipasa

LT: lípidos totales

MK: mevalonato quinasa

MP: membrana plasmática

PC: peso corporal

PH: peso del hígado

p-NA: p-Nitroanilina

PPTasa: preniltransferasa

PT: peso del tumor

RCE1: *RAS-converting enzyme1*

RE: retículo endoplásmico

S: simvastatina

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEM: error estándar de la media

SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal

TG: triglicéridos

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

VM: vía del mevalonato

I

Introducción

I.1. VÍA DEL MEVALONATO: GENERALIDADES

La Vía del Mevalonato (VM) es una ruta metabólica de gran importancia que provee a la célula de moléculas bioactivas vitales para múltiples procesos celulares (Buhaescu y Hassane 2007). Esta vía sintetiza mevalonato a partir de acetato, para luego convertirlo en productos isoprenoides esteroideos como el colesterol (componente esencial de la membrana plasmática, precursor de ácidos biliares y hormonas) y en un amplio número de moléculas hidrofóbicas, isoprenoides no esteroides, como el dolicol (participa en la glicosilación de proteínas), ubiquinona (constituyente de la cadena transportadora de electrones mitocondrial) y grupos isopreno. Estos últimos compuestos intermediarios de la ruta biosintética del mevalonato, juegan un papel importante en la modificación post-traduccional de una gran cantidad de proteínas implicadas en la señalización intracelular y son esenciales en el crecimiento/diferenciación celular, la glicosilación de proteínas y el ensamblaje del citoesqueleto (Buhaescu y Hassane 2007; Zhou y Liao 2009; Mizioro 2011).

La VM es una ruta multienzimática (Figura I.1), que se lleva a cabo en las fracciones microsomal y soluble del citoplasma y fue originalmente descrita en hígado de mamíferos en la década del 50 por Bolch (1952). Comienza con la síntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a partir de acetyl-CoA en un par de reacciones que ocurren en el citoplasma catalizadas por las enzimas acetoacetyl coenzima A (AA-CoA) tiolasa y HMG-CoA sintasa. Estas reacciones se continúan por una reacción que sintetiza mevalonato a partir de HMG-CoA catalizada por una proteína integral de retículo endoplásmico (RE): la HMG-CoA reductasa (HMGCR), siendo ésta la enzima limitante de la vía (Goldstein y Brown 1990). La mevalonato quinasa (MK) es la segunda enzima esencial de la ruta de biosíntesis de isoprenoides / colesterol, después de HMGCR. Cataliza la fosforilación de ácido mevalónico en fosfomevalonato. Aunque MK no es la enzima limitante de la vía, se demostró que su actividad está regulada a través de la inhibición por retroalimentación por

productos de la vía, como el geranilpirofosfato, el farnesilpirofosfato y el geranilgeranilpirofosfato (Hinson y col. 1997). La enzima fosfomevalonato quinasa cataliza el siguiente paso mediando la conversión de mevalonato 5-fosfato a mevalonato 5-difosfato (Buhaescu y Hassane 2007). A partir de este último se genera una molécula de cinco carbonos: isopentenil pirofosfato (IPP) que constituye la unidad estructural cuya polimerización dará origen a los distintos productos poliisoprenoides 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) (Swanson y Hohl 2006; Buhaescu y Hassane 2007).

El FPP constituye el mayor punto de ramificación en la biosíntesis de poliisoprenoides. 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 cabeza-cabeza para formar escualeno, un compuesto de 30 carbonos. La enzima escualeno sintasa cataliza esta reacción, siendo éste el primer paso comprometido en la biosíntesis del colesterol. El escualeno se convierte después de una etapa de ciclación en lanosterol, y éste a su vez transforma en colesterol después de una serie de 19 reacciones adicionales (Buhaescu y Hassane 2007).
- 2) El FPP puede unirse con grupos IPP o con cadenas cortas de poliprenoles por repetidas condensaciones cabeza-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 (Dallner y Sindelar 2000; Bentinger y col. 2010).
- 3) El FPP puede ser convertido en un alcohol poliisoprenoide de cadena larga, el dolicol, a través de una serie de adiciones de 16 residuos de isoprenilo. 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 geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) pueden unirse covalentemente a distintas proteínas con múltiples funciones dentro de la célula (modificación postraduccional) (Berndt y col. 2011; Thurnher y col. 2012; Thurnher y col. 2013). Farnesiltransferasa (FPTasa) y geranylgeranyltransferasa (GGPTasa) son dos enzimas que llevan a cabo la reacción de prenilación en la célula. Este proceso implica la unión covalente del grupo prenilo (o bien el C-15 del FPP o el C-20 del GGPP) con el extremo C-terminal de algunas proteínas, incluyendo la subunidad γ de proteínas G heterotriméricas, proteínas de la lámina nuclear, hemo-A y pequeñas proteínas de unión a GTP (Bonetti y col. 2003). La prenilación promueve la unión de estas proteínas a las membranas celulares. Esta modificación postraduccional y la activación de GTPasas como Rho, Rac, Rab, Rap, Ras juegan un importante papel en muchas cascadas de señalización dentro de la célula (Hinson y col. 1997; Edwards y Ericsson 1999; Bonetti y col. 2003).

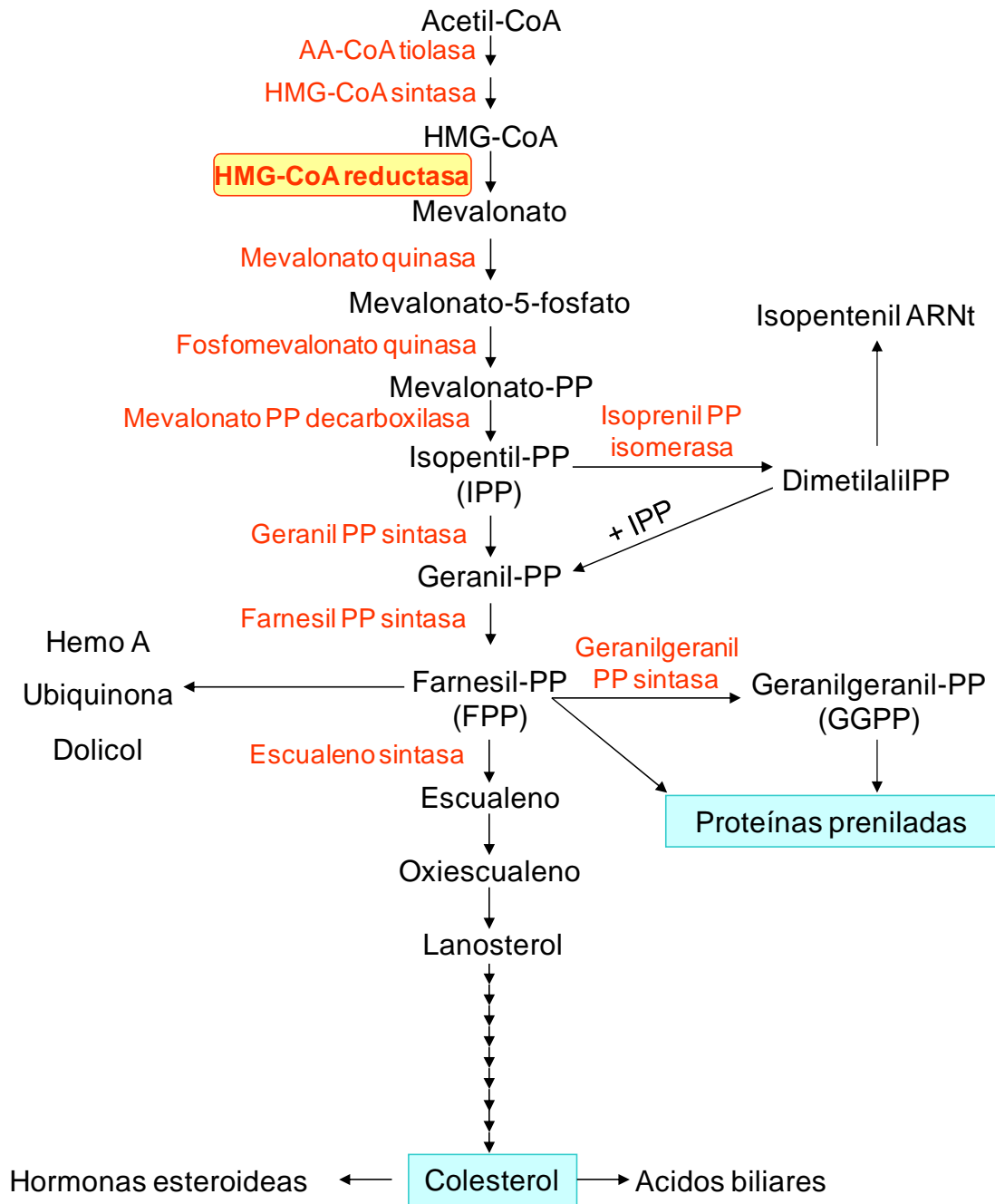


Figura I.1. Vía del Mevalonato. Se representan los intermediarios y productos finales de la vía en color negro, enzimas que intervienen en color naranja.

I.2. VÍA DEL MEVALONATO: REGULACIÓN

De todas las enzimas que participan en la vía, la HMGCR cataliza una reacción irreversible al inicio de la ruta metabólica, lo que la sitúa como principal punto de control (Burg y Espenshade 2011).

HMGCR se regula por los niveles de esteroides intracelulares, quienes median por retroalimentación la transcripción y / o degradación de la enzima, asegurando así la síntesis de esteroides necesarios, pero no su acumulación más allá de los requerimientos celulares (Figura I.2) (Goldstein y Brown 1990).

Las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (*sterol regulatory element-binding protein* –SREBPs–) son factores de transcripción que median la expresión de genes involucrados en la lipogénesis (SREBP1a y SREBP1c) y en el metabolismo del colesterol (SREBP1a, SREBP2) (Horton y col. 2002). SREBP forma un complejo en la membrana del RE con otra proteína, Scap. Cuando los niveles de esteroides celulares son escasos, el complejo se transporta al aparato de Golgi en vesículas revestidas con COPII, gracias al sitio de reconocimiento para COPII que presenta Scap. En el aparato de Golgi, SREBP es activado por dos eventos proteolíticos secuenciales que escinden el dominio NH₂-terminal del factor de transcripción de la membrana (SREBP maduro), lo que le permite ingresar en el núcleo y activar la transcripción génica (Goldstein y col. 2006; Sato 2009). SREBP-1a es un potente activador de todos los genes SREBP-sensibles, incluyendo aquellos que median en la síntesis de colesterol, ácidos grasos, y triglicéridos. Las funciones de SREBP-1c y SREBP-2 son más restringidas, SREBP-1c induce la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ácidos grasos (entre ellos se incluyen para ATP citrato liasa, acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, esteroil-CoA desaturasa, y glicerol-3-fosfato aciltransferasa) pero no para la síntesis de colesterol. SREBP-2, por el contrario, activa la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol (cómo la HMG-CoA sintasa, HMGCR, farnesil difosfato sintasa, escualeno

sintasa y el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLR) descrito en el ítem I.3) (Horton y col. 2002).

Un avance importante en la comprensión de la base molecular de la inhibición de HMGCR por retroalimentación fue el descubrimiento de una proteína de RE llamada Insig; ésta regula HMGCR tanto transcripcionalmente, mediante la inhibición de la activación de SREBP, como postraduccionalmente mediante la ubiquitinización y proteólisis de la enzima (Goldstein y col. 2006). Insig se une a Scap cuando los esteroides son abundantes, alterando su estructura y haciendo que su secuencia de reconocimiento para las proteínas COPII sea inaccesible. Esto evita que el complejo SREBP-Scap sea cargado en vesículas COPII, lo que impide el clivaje proteolítico de SREBP en el aparato de Golgi y de este modo no se libera el extremo NH₂ terminal, responsable de entrar al núcleo y activar la transcripción (Sun y col. 2007). Alternativamente, cuando los niveles de esteroides son bajos, Insig se disocia de Scap permitiendo el transporte de SREBP-Scap hacia el aparato de Golgi y la consecuente activación de SREBP (Espenshade y Hughes 2007).

Además de su papel en la regulación de la transcripción a través de SREBP, Insig también regula la degradación de HMGCR (DeBose-Boyd 2008) reclutando enzimas que la conjugan con ubiquitina cuando abundan los esteroides celulares (Sever y col. 2003; Song y col. 2005; Jo y Debose-Boyd 2010).

HMGCR también está regulada por el estado metabólico celular a través de un mecanismo independiente de Insig que se cree que ayuda a optimizar el gasto de ATP celular durante el estrés metabólico (Burg y Espenshade 2011). La proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase* –AMPK-), originalmente conocida como HMGCoA reductasa quinasa (Hardie y col. 2006), es activada alostéricamente por AMP, pero no por ATP (Corton y col. 1995). Debido a que ATP y AMP compiten para el mismo sitio de unión, la AMPK es capaz de responder cuando la energía celular es baja fosforilando a la HMGCR e inhibiendo su actividad (Omkumar y col. 1994).

La desfosforilación de la HMGCR por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) restaura totalmente la actividad enzimática y junto con la AMPK puede jugar un importante papel en la regulación de la actividad HMGCR través de la fosforilación. Sin embargo, no hay ninguna función fisiológica conocida para la regulación de la PP2A en el control de actividad de la HMGCR (Burg y Espenshade 2011).

Por último, HMGCR también está regulada a nivel de la traducción por isoprenoides no-esteroles (Nakanishi y col. 1988; Goldstein y Brown 1990, Janssens y Goris 2001). Sin embargo, este aspecto de la regulación de HMGCR ha recibido considerablemente menos investigación que otras formas de regulación y por lo tanto su mecanismo no está claro (Burg y Espenshade 2011).

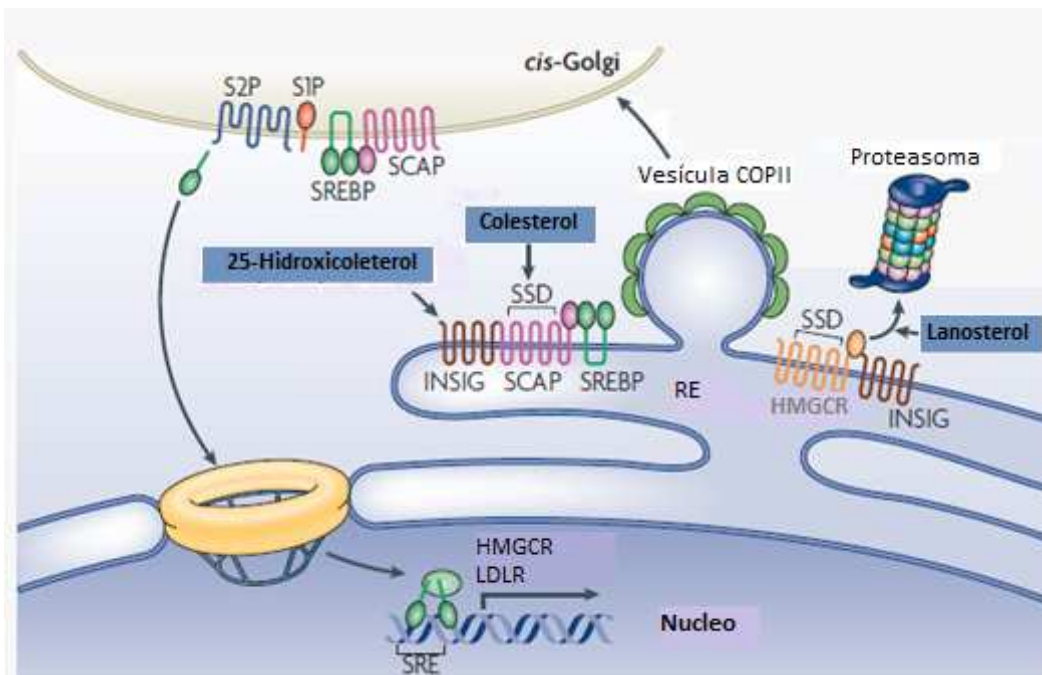


Figura I.2. Regulación de la vía del Mevalonato. SREBP controla la transcripción de la HMGCR y de LDLR. SREBP-Scap reside en la membrana del RE inactivo. Cuando los esteroides celulares son escasos, el complejo se transporta al aparato de Golgi en vesículas COPII. En el aparato de Golgi, SREBP es activado por dos eventos proteolíticos secuenciales que escinden el dominio NH₂-terminal del factor de transcripción de la membrana, lo que le permite entrar en el núcleo y activar la transcripción de la HMGCR y LDLR. Insig se une a SCAP en condiciones celulares donde los esteroides son abundantes haciendo que su secuencia de reconocimiento de COPII sea inaccesible. Insig también regula la degradación de la HMGCR. En condiciones de elevados niveles de esteroides, Insig se une a la región NH₂-terminal de la HMGCR y recluta enzimas que conjugan con ubiquitina a HMGCR. Figura adaptada de Ikonen 2008.

I.3. METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol es necesario para el crecimiento y la viabilidad celular en mamíferos. Sus derivados incluyen los ácidos biliares, lipoproteínas, oxisteroles y hormonas esteroideas. El colesterol es una molécula lipídica esencial para la estructura y el funcionamiento de las membranas celulares, particularmente en la membrana plasmática (Chang y col. 2006). Sin embargo, el exceso de colesterol se lo ha relacionado con diversas enfermedades: se lo identificó por primera vez en 1769 como el componente principal de los cálculos biliares humanos. Desde entonces su concentración fuera de los parámetros aceptables ha sido considerada en una variedad de enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y diversas malformaciones (Cortes y col. 2013). La estructura de colesterol consiste en cuatro anillos (A, B, C, D), con dos grupos metilo angulares situados en C10 y C13; éstas son características de todos los esteroides naturales. El colesterol también contiene un grupo 3β -OH en el anillo A, un doble enlace entre el C5 y C6 y una cadena lateral (isooctilo) en el C17 (Figura I.3). El colesterol del que dispone el organismo tiene dos orígenes: endógeno, procedente de la síntesis *de novo* (descrito en I.1), y exógeno, procedente de la dieta (Chang y col. 2006). El último se transporta inicialmente desde el intestino al hígado desde donde se distribuye a todos los tejidos. Para el transporte a través del medio acuoso (linfa y la sangre), enterocitos y hepatocitos empaquetan colesterol y ésteres de colesterol en lipoproteínas de varios tamaños y composiciones que se modifican en la circulación. Brevemente, el colesterol dietético se absorbe por los enterocitos del intestino delgado y junto con los triglicéridos (TG) es transportado por los denominados quilomicrones. Algunos de los TG se hidrolizan en la circulación dando lugar a los remanentes de quilomicrones que son captados por los hepatocitos (Chang y col. 2006). El hígado juega un rol central en el metabolismo del colesterol sintetizando lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Kwiterovich 2000). Si bien la principal función de las partículas VLDL parece ser el transporte de TG desde el hígado a los

órganos periféricos para oxidación o almacenamiento, estas partículas también contienen colesterol libre y esterificado. Durante el metabolismo de las partículas de VLDL, con la remoción de una extensa porción de TG en los tejidos periféricos, se forma una partícula remanente y una porción de estas partículas (derivadas de las VLDL) es convertida a la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Kwiterovich 2000). Las células de mamíferos adquieren el colesterol exógeno principalmente de LDL, a través de la vía del LDLR (Chang y col. 2006). Las LDL circulantes se unen al LDLR en la superficie celular y se incorporan, como un complejo de lipoproteína-receptor a través de vesículas revestidas de clatrina, en compartimentos endolisosomales para su posterior procesamiento. En este nivel, el LDLR se recicla a la superficie celular, mientras que las partículas de LDL son totalmente degradadas en sus componentes individuales. Más específicamente, los ésteres de colesterol derivados de las LDL se hidrolizan para formar colesterol libre y ácidos grasos (AG) por la acción de la lipasa ácida lisosomal (Cortes y col. 2013). Cuando los tejidos extrahepáticos tienen exceso de colesterol, éste se libera a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), sintetizadas también a nivel hepático. HDL devuelve los lípidos al hígado en un proceso llamado transporte reverso del colesterol (Ohashi 2005). Desde el hígado, el colesterol se excreta en la bilis (ya sea como colesterol o después de que se ha metabolizado a ácidos biliares) que entra en el intestino delgado. A partir de ahí, el colesterol y las sales biliares se reabsorben (ciclo enterohepático) o bien son excretados en las heces (Van der Wulp y col. 2013) (Figura I.4). La proporción de colesterol procedente de la síntesis endógena suele ser mayor que la absorbida de la dieta, y el conjunto de los dos supera a la cantidad de colesterol consumida por el organismo, lo que obliga a metabolizar o excretar, o ambas cosas, el exceso de colesterol para lograr mantener un equilibrio. Los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo de la molécula del colesterol, por lo que sólo pueden modificar ligeramente su estructura. Debido a ello, el colesterol es excretado del organismo en forma inalterada o tras su transformación en otros productos

derivados tales como los ácidos biliares o las hormonas esteroideas (Tall 2008; Van der Veen y col. 2009). La cantidad de colesterol de la dieta varía notablemente de un día a otro, lo que obliga a la existencia de mecanismos de control que permitan mantener el equilibrio entre las velocidades de síntesis y excreción en relación con el que es absorbido. Tales mecanismos de control (descritos en I.2) suelen funcionar correctamente, y garantizar la disponibilidad de las cantidades adecuadas de colesterol para satisfacer las necesidades de los distintos tejidos. En situaciones patológicas tiene lugar un desequilibrio de dichos procesos, lo que lleva a un incremento de los niveles circulantes de colesterol o a un exceso del mismo que es eliminado por vía biliar. En el primer caso, los ésteres de colesterol pueden llegar a acumularse en las células de la pared arterial y originar el desarrollo de la arteriosclerosis (Kwiterovich 2000; Van der Wulp 2013). En el segundo, la bilis puede llegar a sobresaturarse de colesterol, que al final precipita, dando lugar a cálculos biliares (Portincasa y col. 2006; Wang y col. 2009).

El colesterol alcanza notoriedad debido a la fuerte correlación entre los niveles elevados de colesterol en sangre (hipercolesterolemia), fundamentalmente transportado por LDL, y la incidencia de enfermedades del sistema cardiovascular en el hombre. La importancia de este lípido y muy especialmente de su vía de síntesis se ha incrementado con el descubrimiento del importante rol de la colesterogénesis en el crecimiento y proliferación celular (véase ítem I.4).

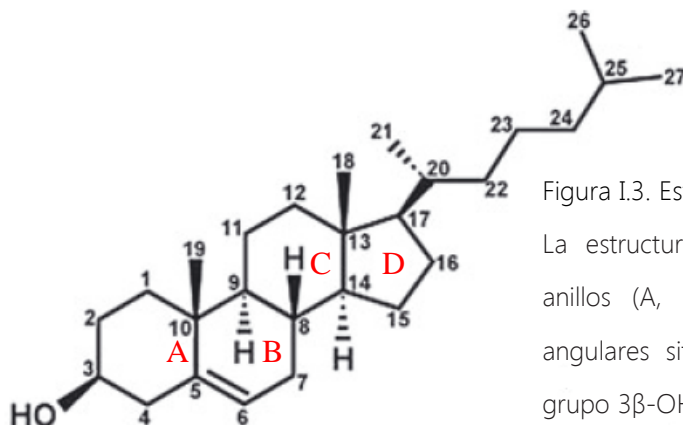


Figura I.3. Estructura de la molécula del Colesterol. La estructura de colesterol consiste en cuatro anillos (A, B, C, D), con dos grupos metilo angulares situados en C10 y C13, contiene un grupo 3 β -OH en el anillo A, un doble enlace entre C5 y C6 y una cadena lateral (isooctilo) en C17.

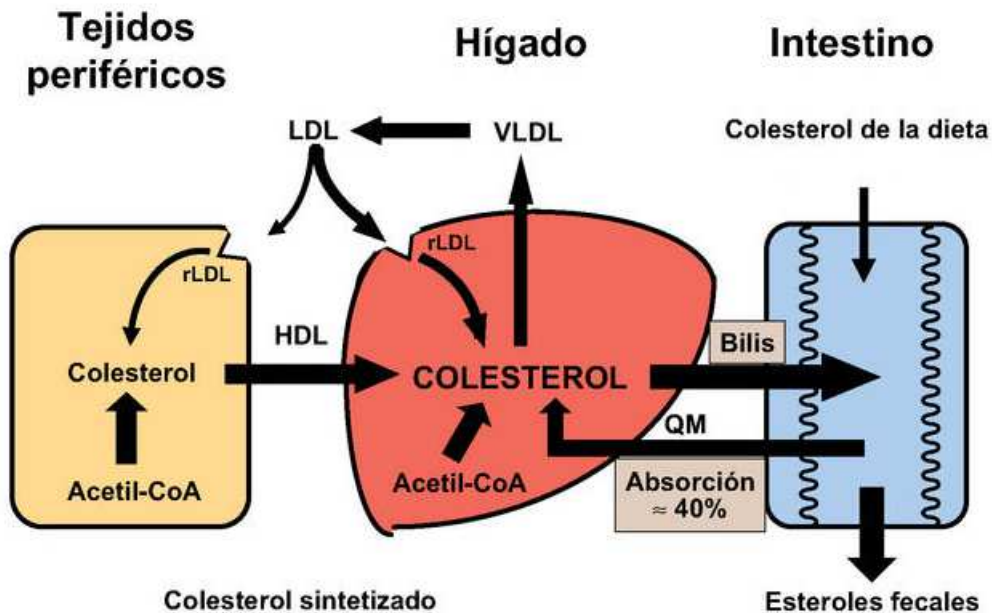


Figura I.4. Transporte de colesterol. El colesterol y los triglicéridos dietéticos son absorbidos por los enterocitos del intestino delgado en los quilomicrones. Algunos de los triglicéridos se hidrolizan en la circulación dando lugar a los remanentes de quilomicrones que son tomadas por los hepatocitos. El hígado sintetiza VLDL que son metabolizadas en el torrente sanguíneo con la remoción de una extensa porción de TG por los tejidos periféricos, se forma una partícula remanente y una porción de estas partículas (derivadas de las VLDL) es convertida a LDL. Las células de mamíferos adquieren el colesterol exógeno principalmente de LDL, a través de la vía del receptor de LDL. Cuando los tejidos extrahepáticos tienen exceso de colesterol, éste se libera a las HDL que devuelve los lípidos al hígado en un proceso llamado transporte reverso del colesterol. Desde el hígado, el colesterol se excreta en la bilis (ya sea como colesterol o después de que se ha metabolizado a ácidos biliares) que entra en el intestino delgado. A partir de ahí, colesterol y sales biliares se reabsorben (ciclo enterohepático) o bien son excretados en las heces. Figura adaptada Ros 2006.

I.4. VÍA DEL MEVALONATO Y CÁNCER

Como se mencionó anteriormente la vía del mevalonato proporciona diversas clases de productos finales. Estos incluyen el colesterol, proteínas farnesiladas y proteínas geranylgeraniladas, como también esteroides, ácidos biliares, dolicoles, hemo A, ubiquinona e isopentenil adenina (Swanson 2006; Buhaescu y Hassane 2007; Thurnher y col. 2013). Las células cancerosas proliferan rápidamente y por lo tanto pueden requerir un aumento de la concentración de todos estos productos para el crecimiento celular óptimo. Una mayor demanda de colesterol se puede lograr por un aumento de la actividad HMGCR y/o una absorción de colesterol extracelular aumentada a través del receptor de LDL (Espenshade y Hughes 2007). En las células malignas se incrementa el nivel y la eficacia catalítica de HMGCR en comparación con las células normales (Kawata y col. 1990; Harwood y col 1991), en estas células la HMGCR es resistente a la modulación transcripcional mediada por los esteroides; sin embargo, la regulación postranscripcional de la enzima permanece intacta (Duncan y col. 2004).

La prenilación de las proteínas celulares permite el anclaje de pequeñas GTPasas en las membranas celulares (Wright y Philips 2006; Cuello y col. 2013). Estas proteínas están involucradas en la transducción de señales, que regulan el control del crecimiento celular y la apoptosis. La modificación postraduccional se lleva a cabo por preniltransferasas, donde la FPTasa cataliza la adición del FPP a la proteína, proceso denominado farnesilación y geranylgeranyl transferasas GGPTasa I y II catalizan la adición de uno o dos residuos de GGPP, proceso denominado geranylgeranilación. Las proteínas farnesiladas incluyen a: Ras, Rho B, HDJ2 y láminas A y B y las proteínas geranylgeraniladas incluyen: Rab, Rap 1A, Rho A, Rac 1, CDC42 (Swanson y Hohl 2009). La prenilación ocurre en una secuencia C-terminal CAAX (donde C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X puede ser cualquier aminoácido), el residuo C se conjuga con FPP o GGPP. Esto se continúa por la eliminación proteolítica del tripéptido AAX a cargo de la endopeptidasa *RAS-*

converting enzyme1 (RCE1) y por carboximetilación en el residuo de cisteína isoprenilado por *isoprenylcysteine carboxymethyltransferase* (ICMT) en el RE. Posteriormente, algunas de la GTPasas, como H-Ras y K-Ras, son palmitoiladas en el Golgi. Finalmente, son transferidas a la membrana plasmática, a la cual se unen a través de su grupo farnesilo o geranylgeranilo, y restos de palmitoilo (Figura I.5)(Jakobisiak y Golab 2010).

Las GTPasas pequeñas hidrolizan GTP a GDP. Cuando une GTP, el complejo gatilla la cascada de traducción de señales a la cual se acopla. Algunas mutaciones específicas resultan en una activación continua de las mismas (Walker y col. 2005; Swanson y Hohl 2009; Gysin y col 2011). La proteína Ras es la GTPasa más estudiada, impulsa varias vías involucradas en la progresión del ciclo celular y en la apoptosis. La presencia de una mutación de Ras en la célula se ha asociado con malignidad debido a la estimulación anómala de estas vías lo que contribuye a la oncogenicidad de la proteína. Ras en citoplasma es, sin embargo, mitogénicamente inactiva (Walker y col. 2005; Swanson y Hohl 2009; Gysin y col. 2011).

El crecimiento tumoral refleja la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular, mientras que el proceso de metástasis depende principalmente de la migración celular. Las GTPasas de la familia Rho son bien conocidas como reguladores de la migración celular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto, la adherencia célula-célula y la adherencia célula-sustrato (Ridley 2001; Etienne-Manneville y Hall 2002). En general se piensa que las proteínas Rho contribuyen al cáncer principalmente a través de sus efectos sobre la migración celular, lo que influye en la invasión y metástasis. Sin embargo, los miembros de la familia Rho también pueden influir sobre la supervivencia celular, el crecimiento y la proliferación, al menos así se ha reportado in vitro (Ridley 2004).

La angiogénesis es el surgimiento de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes, es un proceso de múltiples etapas que implica proliferación, migración, y diferenciación de las células endoteliales, remodelación

de la matriz extracelular, y maduración funcional de los nuevos vasos sanguíneos (Weis y col. 2002). El proceso de crecimiento del tumor es dependiente en gran medida de una expansión del suministro vascular (Merajver y Usmani 2005). Las proteínas Rho son capaces de alterar la expresión y actividad de los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos (Merajver y Usmani 2005; Bryan y d'Amore 2007). De este modo se relaciona a la VM tanto con la proliferación, como con la migración y la angiogénesis celular, lo que la coloca como blanco de estudios relacionados con la terapia contra el cáncer.

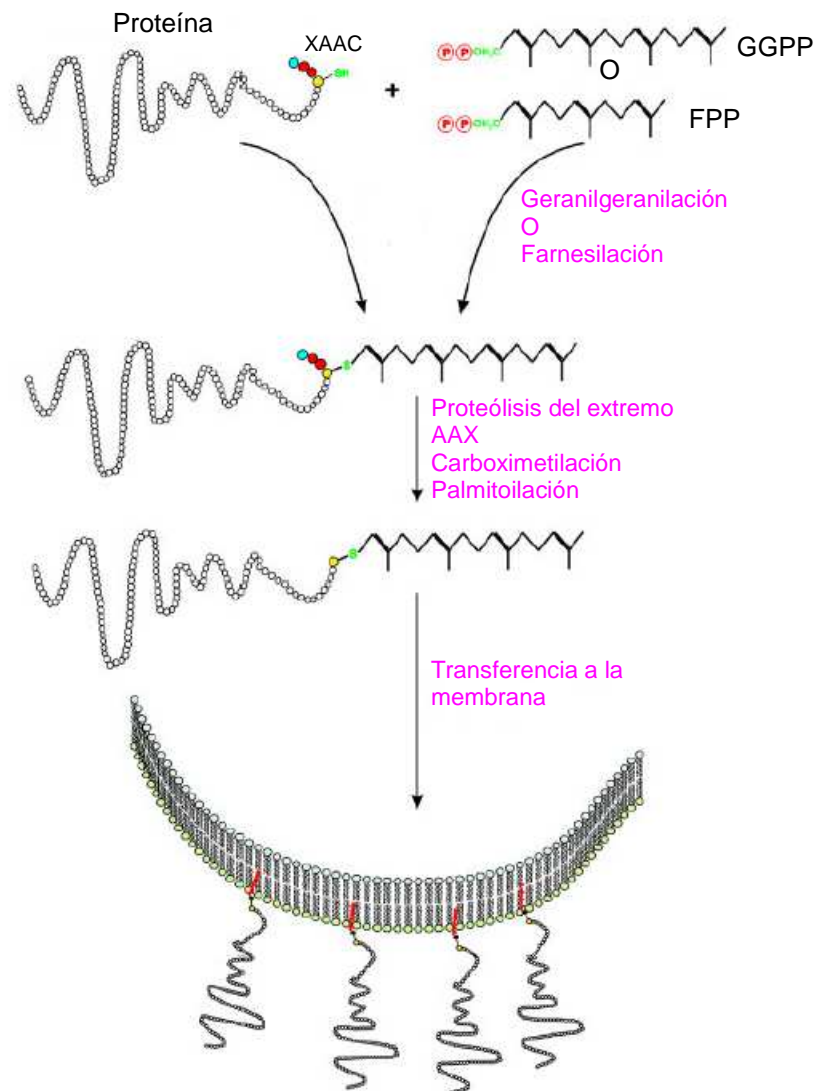


Figura I.5. Isoprenilación de proteínas y reacciones post-prenilación. Proteínas como RAS, RHO y RAC se isoprenilan en el residuo de cisteína dentro de la secuencia C-terminal CAAX. Seguido por la eliminación proteolítica del tripéptido AAX a cargo de la endopeptidasa RCE1 y por carboximetilación en el residuo de cisteína isoprenilado por ICMT en el retículo endoplásmico. Posteriormente, algunas de la GTPasas, como H-Ras y K-Ras, son palmitoiladas en el Golgi. Finalmente, son transferidas a la membrana plasmática, a la cual se unen a través de su grupo farnesilo o geranylgeranilo, y restos de palmitoilo. Figura adaptada de Jakobisiak y Golab 2010.

I.5. ESTATINAS

La familia de las estatinas está constituida por drogas naturales (de origen fúngico), semisintéticas (obtenidas por modificaciones de las anteriores) y sintéticas. Estos compuestos son estructuralmente similares a la mevalonolactona, característica que les posibilita actuar como inhibidores competitivos de la HMGCR (Istvan y Deisenhofer 2001). Las estatinas se utilizan con éxito en el tratamiento de la hipercolesterolemia, ya que ocasionan una disminución del contenido de colesterol celular que se traduce, vía SREBPs, en un incremento del número de receptores para LDL con el concomitante aumento de la captación de LDL-colesterol del plasma (Goldstein y Brown 1990; Brown y Goldstein 1997; 1999). También incrementan los niveles de lipoproteínas de alta densidad mejorando así los perfiles de colesterol sanguíneo y reduciendo la morbi-mortalidad cardiovascular en pacientes dislipidémicos (Gaw 2003; Wierzbicki y Poston 2003).

La dosis recomendada en terapias hipocolesterolemiantes en humanos es menor a 1mg/Kg/día. Pero, aún a dosis terapéuticas, las estatinas causan en ocasiones disfunción hepática, progresión de las cataratas, disfunción eréctil, miopatías, sensibilidad al tacto o debilidad con niveles elevados de creatina quinasa. A veces la miopatía toma la forma de rabdomiólisis con o sin insuficiencia renal aguda secundaria a la mioglobinuria y, en raros casos, ha sobrevenido la muerte. El riesgo de miopatía aumenta por factores predisponentes (edad, sexo, tamaño corporal), con el incremento de las concentraciones plasmáticas de estatinas y con el uso concomitante con diversas drogas como inhibidores de citocromo P450 y otros fármacos reductores de lípidos (Rosenson 2004).

En los últimos años se ha evaluado a las estatinas como potenciales agentes antitumorales, ya que al inhibir la HMGCR limitaría los intermediarios de la vía, entre los cuales se incluyen algunos isoprenoides; de este modo proteínas claves para la angiogénesis, proliferación y migración celular no podrían ser modificadas covalentemente, ya sea con FPP o GGPP, y así serían biológicamente inactivas,

debido a su incapacidad de anclarse en la membrana (Bardou y col. 2010; Jakobisiak y Golab 2010; Shimoyama 2011).

La inhibición de la proliferación celular por estatinas se ha descrito en diversas líneas celulares (Kikuchi y col. 1997; Kusama y col. 2001; Wu y col. 2004). Sin embargo, *in vivo* los resultados son contradictorios, dependiendo en parte de la dosis utilizada, de la vía de administración y de la velocidad de crecimiento del tumor (Swanson y Hohl 2006; Kim y col. 2001; Polo y Bravo 2001). También son contradictorios los resultados respecto a la asociación del uso de estatinas con el riesgo de contraer determinados tumores (Poynter y col. 2005; Jacobs y col. 2006). Por lo cual la utilización de las estatinas como drogas antitumorales es muy discutida.

I.6. MONOTERPENOS: GERANIOL

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces) (Burt 2004). Los monoterpenos, como el geraniol, d-limoneno, linalool, perililalcohol y mentol son componentes no nutritivos de la dieta presentes en aceites esenciales de frutas cítricas, cereza, romero, albahaca, menta y otras hierbas aromáticas. Estos isoprenoides de 10 carbonos (se han reportado más de 22.000 de estos compuestos) son derivados de la vía del mevalonato en plantas pero no son producidos por mamíferos ni hongos (Mc Gravery y Coteau 1995).

Aunque numerosos estudios han informado de la inhibición no competitiva de la HMGCR por isoprenoides, los niveles específicos en los que se regula la enzima no han sido bien caracterizados. Como se mencionó anteriormente, la inhibición de HMGCR disminuye los niveles elevados de colesterol ampliamente requeridos por las células cancerosas que crecen rápidamente, inhibe la prenilación de ciertas proteínas reguladoras del crecimiento que juegan un papel clave en el control de la proliferación celular, e induce la apoptosis (Mo y Elson 1999; Joo y Jetten 2010).

El geraniol (G) (3,7-dimetilocta-trans-2,6-dien-1-ol) es un monoterpeno-alcohol acíclico cuya fórmula química es $C_{10}H_{18}O$. El producto mencionado como "geraniol" es una mezcla de los dos isómeros cis-trans, el geraniol propiamente dicho (trans) y el nerol (cis) (Figura I.6.A). El G es un constituyente común de varios aceites esenciales y se sintetiza en *Monarda fistulosa* y en los aceites de ninde (lamiáceas), de rosa, de palmarosa y de citronella entre otros (Figura I.6.B) (Chen y Viljoen 2010). Es un ingrediente utilizado por su fragancia en cosmética decorativa, fragancias finas, champúes, jabones de tocador y otros artículos de tocador, así como en los productos no cosméticos tales como productos de limpieza y detergentes (Lapczynski y col. 2008; Chen y Viljoen 2010). Un estudio de los productos de consumo reveló que está presente en el 76% de desodorantes investigados en el mercado europeo, incluyendo el 41% de productos domésticos y de limpieza para el hogar y el 33% de las formulaciones cosméticas basado en ingredientes naturales. Su producción supera las 1.000 toneladas métricas por año (Chen y Viljoen 2010). Además, el G exhibe diversas propiedades bioquímicas y farmacológicas: es un eficaz repelente de insectos natural y su potencial como agente antimicrobiano se ha destacado en varios estudios. A su vez han sido evaluados una gran diversidad de efectos biológicos importantes más allá de los mencionados, como con su actividad antihelmíntica, anticarcinogénica, efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Chen y Viljoen 2010).

Si bien se encuentra documentado en la bibliografía que el geraniol inhibe la HMGCR no es claro a qué nivel lo realiza, y sólo ha sido reportado en ensayos *in vitro* que esta modulación podría ser a nivel post-transcripcional (Peffley y Gayen 2003; Crespo y col. 2013).

Al igual que lo hipotetizado para las estatinas, la inhibición de la enzima limitante de la vía del mevalonato por G lograría la disminución del colesterol intracelular con lo cual aumentaría, vía SREBP, la síntesis de LDLR, logrando así captar una mayor cantidad del colesterol plasmático y pudiendo tener, por lo tanto, un efecto

hipocolesterolemiante. Pese a lo anterior son escasos en la bibliografía los trabajos de G como agente hipocolesterolemiante. Por el contrario, se han datado muchos ensayos que proponen al G como agente antiproliferativo *in vitro* y como agente quimiopreventivo *in vivo* (Burke y col. 1997; Carnesecchi y col. 2001; Ong y col. 2006; Wiseman y col 2007; Ahmad y col. 2011; Jin y col. 2013). Adicionalmente se ha planteado que los monoterpenos podrían tener un beneficio adicional ya que regularían las PPTasas, enzimas responsables de la prenilación (Duncan y col. 2004; Mo y Elson 2004; Swanson y Hohl 2006).

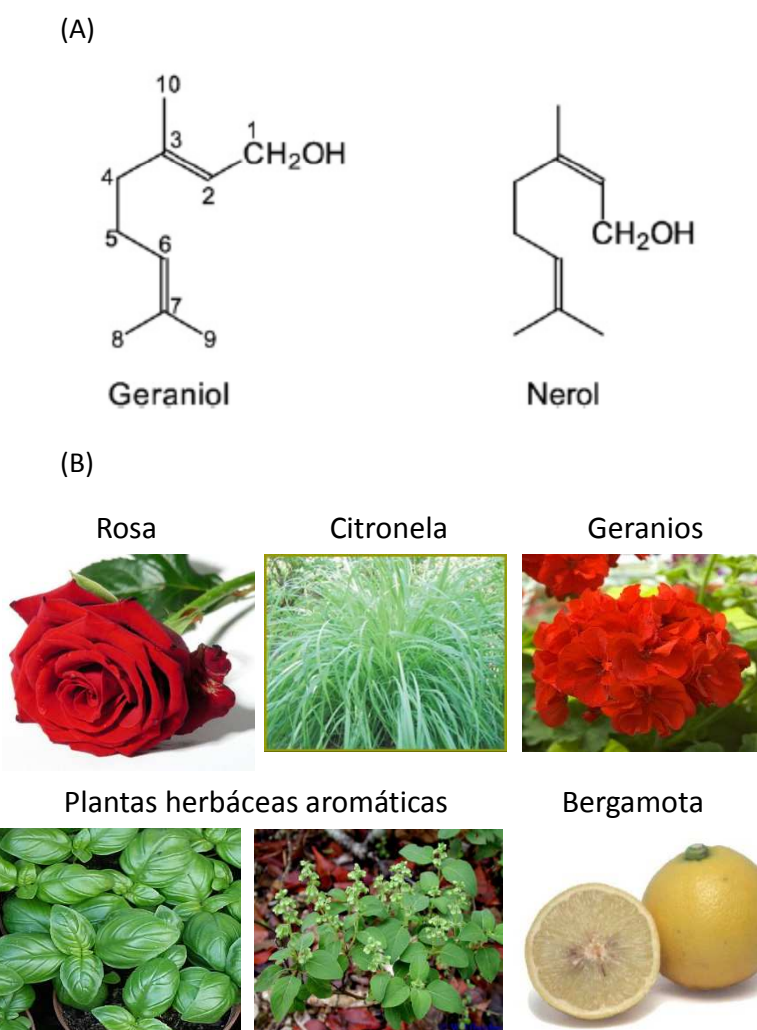


Figura I.6. Geraniol. (A) Estructura química del Geraniol, el G es una mezcla de los dos isómeros cis-trans, el geraniol propiamente dicho (trans) y el nerol (cis). (B) El geraniol se encuentra presente en aceites esenciales de ciertas plantas aromáticas y frutas cítricas como las que se ejemplifican en la figura.

I.7. HIPOTESIS DE TRABAJO

- Debido a sus múltiples efectos sobre la vía del mevalonato, los monoterpenos tendrían "in vivo" efectos hipocolesterolemiantes y antitumorales
- El hecho de que la inhibición de la HMGCR por los monoterpenos se produzca a través de un mecanismo diferente del empleado por las estatinas y que además afecten a la vía del mevalonato a otros niveles, sugiere la posibilidad de que el uso combinado de estatinas con monoterpenos naturales permita disminuir la dosis efectiva de estatinas en el tratamiento de hipercolesterolemias e incrementar la eficacia de ambos compuestos.

I.8. OBJETIVOS

- Evaluar in vivo la actividad hipocolesteremiante e hipolipemiante del geraniol, y avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de este monoterpeno en el metabolismo del colesterol y los triglicéridos mediante el estudio de la expresión de genes claves como el de HMGCR, el receptor de LDL y de SREBP. De este modo, se avanzará en el conocimiento de los beneficios que aporta G en la prevención / tratamiento de enfermedades cardiovasculares.
- Estudiar el efecto antitumoral de G y de las estatinas in vivo, utilizando un modelo de adenocarcinoma de pulmón humano, en células A549 implantadas en ratones atómicos, con el fin de aportar conocimientos sobre los mecanismos por los cuales podrían ejercer actividad antitumoral, como así también determinar la relación existente entre la VM y el control del crecimiento celular.
- Estudiar el efecto y mecanismo de acción de la combinación de estatinas (simvastatina) con monoterpenos (G) sobre el metabolismo lipídico, la síntesis de colesterol y el crecimiento tumoral.

II

Materiales y Métodos

II.1 REACTIVOS

El geraniol (98%) fue suministrado por Sigma. La simvastatina fue provista gentilmente por Merk. Los reactivos inorgánicos y solventes de grado analítico se obtuvieron de Merck, Analyticals Carlo Erba y Sigma. [¹⁴C]acetato de metilo (54.7Ci/mol) se adquirió de Perkin Elmer Life Sciences, Inc.

II. 2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA UTILIZADA EN ANIMALES

II.2.1. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones NIH hembras portadores del genotipo *nu/nu*. Se experimentó con hembras (*nu/nu*) ya que en estudios del laboratorio se demostró que los machos (*nu/nu*) son hipocolesterolémicos e hipotrigliceridémicos, no así las hembras y/o ratones heterocigotas (*+/nu*) (Bravo y col. 2006). 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 que denominó *nude* (desnudo), simbolizado *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 aparejado, los homocigotos (*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 la supervivencia suficientemente prolongada para permitir el desarrollo de los protocolos experimentales.

Animales de aproximadamente un mes de edad, fueron provistos por bioterio del Centro Atómico Ezeiza (CNEA) y criados en nuestro bioterio que se halla especialmente equipado para garantizar las condiciones de asepsia necesarias, 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 standard de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma, cuya composición se detalla en la tabla II.1. Se les permitió libre acceso al consumo de agua acidulada (pH= 3) esterilizada en autoclave.

Tabla II.1. Composición del alimento

	Composición centesimal (%)
Proteínas *	24
Extracto etéreo *	6
Fósforo	0.5-0.9
Humedad **	13
Fibra **	7
Calcio	1-1.2
Minerales **	8

* Valores mínimos

** Valores máximos

II. 2.2. DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DEL TUMOR DE LA LÍNEA DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN (A549) EN RATONES "NUDE"

Se trabajó con la línea tumoral de pulmón (A549) proveniente de un adenocarcinoma humano de células alveolares donación de la Dra. Amada Segal-Eiras (Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas de la Facultad de Cs. Médicas, UNLP). Los cultivos de esta línea tumoral se realizaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) con sales de Earle y piruvato de potasio, con 10% de suero fetal bovino.

La condición atímica de los ratones nude conduce a un profundo déficit de la inmunidad adaptativa 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.

Células A549 fueron resuspendidas en MEM sin suero fetal bovino e implantadas en el espacio interescapular en los ratones (aproximadamente 10^7 células/ratón), observándose desarrollo local seis semanas después del implante primario. El tumor fue mantenido por repiques sucesivos, realizados cada dos meses. Para ello el tumor fue removido quirúrgicamente, se lavó con MEM y se eliminaron las regiones necrosadas. Se cortó con tijera y se disgregó el tejido haciéndolo pasar por una malla de acero de 1mm^2 obteniéndose, de este modo, una suspensión de tejido conteniendo aproximadamente 300mg de tejido/ml. Finalmente cada animal, fue inoculado subcutáneamente con 0.2ml de suspensión de tejido (Figura II.1). 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. De acuerdo a lo observado en estudios previos (Manning y col. 1973) y a la experiencia en nuestro laboratorio la inoculación subcutánea de A549 no produce metástasis. El tumor incrementó progresivamente su tamaño, llegando a alcanzar dimensiones mayores a los 4g.



Figura II.1. Mantenimiento del tumor. Animales con tumor primario (inóculo de células A549 en cultivo) se sacrificaron y se obtuvieron los tumores para mantenerlos por repiques sucesivos. El tejido tumoral obtenido se lavó con MEM, se disgregó y se pasó por una malla de acero hasta obtener una suspensión uniforme de 300mg/ml aproximadamente. Se inyectaron animales nude sin tumor con 0.2ml de la suspensión de tejido tumoral. Todos los procedimientos se realizaron en estrictas condiciones de esterilidad.

II.2.3. MEDIDA DE LAS DIMENSIONES TUMORALES

Cuando los tumores implantados se tornaron palpables fueron medidos al menos dos veces por semana con calibre 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 (Figura II.2). El tamaño de los tumores fue expresado ya sea como volumen total o cómo volumen relativo. Este

último fue calculado por la fórmula V_i/V_0 , donde V_i es el volumen tumoral medido en el tiempo i y V_0 es el volumen tumoral medido al inicio de cada experimento (Houchens y col. 1978).



Figura II.2. Medición de las dimensiones tumorales. Se midió el ancho (a) y el largo (b) del tumor con calibre y se aproximó su volumen según la fórmula del elipsoide: $V= a^2 \cdot b / 2$.

II.2.4. OBTENCIÓN DE LA SAL SÓDICA DE SIMVASTATINA

La simvastatina es normalmente administrada bajo la forma de lactona insoluble en agua, en el intestino delgado con el pH alcalino se transforma en la forma aniónica activa y es absorbida. Dado que en estos experimentos la droga fue suministrada a los animales a través del agua de bebida fue necesario convertirla previamente en su forma aniónica soluble. Para obtener la sal sódica se utilizó la técnica descrita

por Sebti y col. (1991) levemente modificada. Se disolvió la Simvastatina en etanol absoluto a 60°C y se adicionó una cantidad equimolar de NaOH. Después de 1 hora de calentamiento, se evaporó el etanol bajo corriente de N₂ y la sal sódica de simvastatina así obtenida fue disuelta en agua esterilizada a una concentración final apropiada.

Debido a la condición atómica de los animales antes mencionada, la obtención de dicha sal se realizó bajo estrictas condiciones de esterilidad.

II.2.5. PREPARADO DEL ALIMENTO SUPLEMENTADO CON GERANIOL

Teniendo como objetivo evitar el elevado nivel de estrés que se le produce al animal cuando es inyectado diariamente y/o alimentado forzosamente con sonda, se administró geraniol por vía oral, incorporando éste en el alimento proporcionado. Para lo cual, previamente se diluyó la cantidad correspondiente de G en cloroformo (CHCl₃). Esta dilución fue incorporada gota a gota en cada grano de alimento, el cual se dejó toda la noche en una cabina de flujo laminar con el fin de evaporar el solvente, que resultaría tóxico para el animal.

II.3. METODOLOGÍA ESPECÍFICA DE LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS EVALUADOS

II.3.1. OBTENCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y SEPARACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los lípidos totales de tejido hepático y tumoral fueron extraídos empleando el método de Folch y col. (1957). Se disgregó el tejido mecánicamente y posteriormente se adicionó una mezcla de solventes cloroformo:metanol (2:1 v/v) en una proporción 20:1 (volumen de solvente/gr de tejido). Se agitó vigorosamente y se mantuvo a 4°C toda la noche. Se filtró el extracto con papel Whatman y 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. Una alícuota de la misma fue utilizada para separar lípidos neutros y otra alícuota para separar lípidos insaponificables y ácidos grasos.

Los lípidos neutros fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC). Este método permite la separación de los componentes de la mezcla según su polaridad, de acuerdo a la afinidad que posean por cada fase. La fase móvil, no polar, está compuesta por éter de petróleo, éter etílico y ácido acético en una proporción (80:20:1) y la fase estacionaria, polar, la compone el agua retenida en la sílica de la placa (Christie y Xianlin 1982).

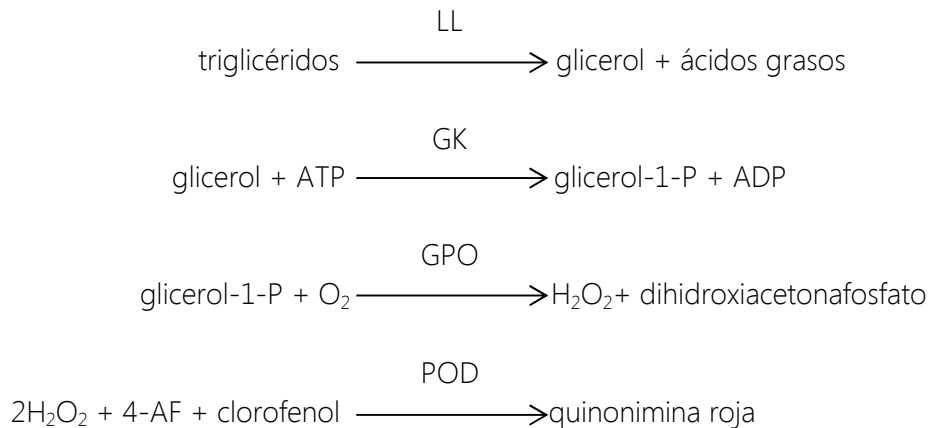
Se utilizaron placas de vidrio de silicagel (G60) de 20x20cm y 0.25mm (Merck) previamente activadas durante 30 min a 110-120°. La placa se reveló por carbonización con $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ a 180°C (Jung 1973). Se cuantificó la cantidad de colesterol y ésteres de colesterol con una curva de referencia realizada con los estándares de calibración sembrados. La intensidad de las bandas obtenidas fue cuantificada utilizando el analizador de imágenes "Image J".

II.3.2. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

La zona de la sílica correspondiente a los triglicéridos (TG) detectada mediante tinción con yodo en la placa de TLC donde se separaron los lípidos neutros (item II.3.1) fue raspada (previo al revelado con $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$) y se extrajeron los TG con cloroformo. Las muestras se centrifugaron, se separó la sílica del extracto clorofórmico y este se evaporó a seco. Los TG se cuantificaron utilizando el *Kit* enzimático comercial "TG color" de Wiener lab. (Rosario, Argentina). Los cálculos se efectuaron mediante extrapolación con una curva de referencia realizada con trimiristina (10-80mg/ml) sembrado en la placa de TLC en forma conjunta con las muestras.

Fundamento del método: La mezcla de reacción compuesta por cuatro enzimas (lipoproteín lipasa (LL), glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidada (POD)), por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), clorofenol y por 4-amino-

fenazona (4-AF), permite la formación de un compuesto coloreado medible a 505nm en espectrofotómetro debido a las reacciones que se detallan a continuación:



II.3.3. OBTENCION Y SEPARACIÓN DE LÍPIDOS INSAPONIFICABLES Y ÁCIDOS GRASOS TOTALES.

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. Se tomaron alícuotas de los extractos lipídicos obtenidos (como se describe en el ítem II.3.1.) y se les agregó una solución de KOH al 10% en metanol en una proporción de 8 ml por gramo de lípido, se gasearon con nitrógeno para evitar oxidaciones y en recipientes herméticos se los calentó a 80°C durante 45 min. Los lípidos insaponificables fueron extraídos con éter de petróleo, repitiendo esta operación tres veces. Completada la extracción de lípidos insaponificables se acidificó el medio con HCl para desplazar el equilibrio hacia la formación de ácidos grasos, los cuales fueron extraídos, también, con 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 fueron almacenados bajo atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad y a -20°C , hasta el momento de su análisis.

II.3.4. INCORPORACIÓN DE ACETATO EN LÍPIDOS TOTALES, LÍPIDOS INSAPONIFICABLES Y ÁCIDOS GRASOS

El material radiactivo se inyectó a los ratones intraperitonealmente tres horas previas al sacrificio ($25\mu\text{Ci}/\text{animal}$). Se extrajeron los lípidos totales, se separaron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos totales (ítems II.3.1 y II.3.3) y se determinó la radiactividad total incorporada en estos lípidos en un contador de centelleo Wallac 1214 Rackbeta liquid scintillation counter (Pharmacia, Turku, Finland).

Los distintos componentes del insaponificable fueron separados por TLC usando cloroformo como fase móvil. Finalmente se midió la radioactividad incorporada en cada componente por autorradiografía exponiendo la placa a una pantalla Storage Phosphor GE-Healthcare.

II.3.5. OBTENCIÓN DE SUERO

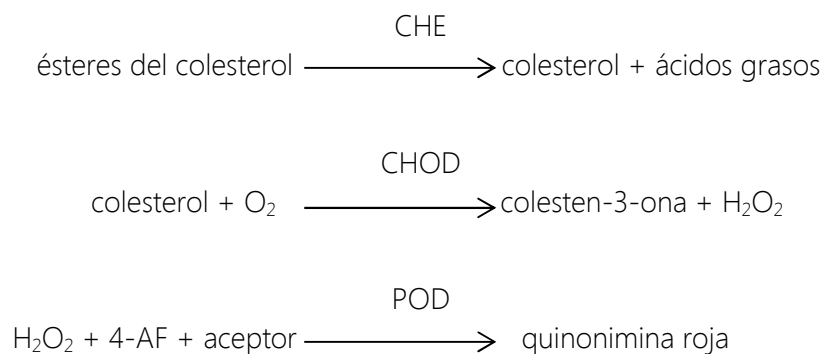
Se obtuvieron muestras de sangre de los animales al momento del sacrificio por punción cardíaca. Para la obtención del suero, estas muestras se incubaron a 37°C durante 30 min para favorecer la reacción de coagulación y a continuación se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 5-10 min. Finalmente se separó el suero del paquete globular y el primero se reservó a -20°C (una semana como máximo) para su análisis.

II.3.6. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL SÉRICO

La concentración de colesterol correspondiente a cada muestra de suero se determinó utilizando el *kit* comercial "Colestat" de Laboratorios Wiener (Rosario,

Argentina) adaptado para ser usado en suero de ratones nude, cuya concentración de colesterol es aproximadamente 0.9 g / l.

Fundamento del método: La mezcla de reacción compuesta por tres enzimas (colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidada (POD)), por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y por 4-amino-fenazona (4-AF), permite la formación de un compuesto coloreado medible a 505nm en espectrofotómetro debido a las reacciones que se detallan a continuación:



De este modo se puede cuantificar el contenido de colesterol de cada muestra extrapolando los resultados con la curva de calibración realizada con el estándar correspondiente, provisto por el *kit*.

II.3.7. DETERMINACIÓN DE TRIGLICERIDEMIA

Para determinar el contenido de triglicéridos en suero se utilizó el *Kit* enzimático "TG color" descrito anteriormente en ítem II.3.2.

II.3.8. CUANTIFICACIÓN DE GERANIOL EN SANGRE DE RATONES TRATADOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA CAPILAR-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

El análisis por cromatografía gaseosa capilar-espectrofotometría de masas fue realizado en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL Agilent. Las condiciones fueron: columna no polar ZB-5HT Inferno de 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm film; gas portador helio a 1.0ml/min de flujo constante;

programa de temperatura de horno 40°C (1 min) hasta 300°C a 10°/min (15 min); el inyector fue operado en modo splitless a 270°C. Las condiciones del detector fueron: energía de ionización 70 eV; rango de masas analizado 35-600 uma; línea de transferencia a 300°C; la cámara de ionización a 230°C y el cuadrupolo a 150°C. El sistema fue operado y los datos colectados desde un MSD ChemStation Agilent Technologies Inc.

Colección de muestras: Se colectaron 200-300µl de sangre entera en viales heparinizados de 4ml. Se cerraron herméticamente con tapas con septum y se capturaron los volátiles con una fibra PDMS / DVB por 15 min a 50°C.

El G fue identificado y cuantificado comparando su tiempo de retención relativo y el área bajo el pico con su estándar.

II.4. METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD DE HMGCR

II.4.1. OBTENCIÓN DE MICROSOMAS DE HÍGADO

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removieron rápidamente los hígados. Trabajando sobre hielo se les eliminó los tejidos extraños y fueron lavados, pesados y homogeneizados siguiendo la proporción de 10 ml de solución homogeneizadora (Tris/HCl (pH= 7.4) 50mM; sacarosa 300mM; NaCl 50mM; EDTA 10mM y DTT 10mM) 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 fracción microsomal se obtuvo por centrifugación diferencial. Luego de filtrar por gasa al homogenado crudo, se lo 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 105.000 x g durante 60 min en una ultracentrífuga refrigerada Beckman L8-70M,

rotor 50 Ti, mantenida a 1-4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet microsomal obtenido se almacenó a -80°C. El mismo conserva aproximadamente el 100% de la actividad de HMGCR durante un período no mayor a 15 días (Al-Shurbaji y col. 1991).

En el momento de ser utilizado, el pellet se resuspendió en buffer de resuspensión (Imidazol/HCl 20mM pH= 7.4 y DTT 5mM) de forma tal de obtener 10mg de proteína microsomal/ml.

La cantidad de proteínas en las suspensiones microsomales se determinó por medio de la técnica de Bradford (1976) detallada en el inciso II.5.2.b.

II.4.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE HMGCR

El ensayo se basa en la medición espectrofotométrica de la disminución de la absorbancia a 340 nm, que representa el consumo de NADPH por la subunidad catalítica de HMGCR en presencia de su sustrato HMG-CoA, siendo la reacción catalizada como se grafica a continuación:



Este ensayo se realizó en tejido hepático, utilizándose como fuente de enzima la suspensión microsomal (obtenida como se detalla en el inciso anterior).

Para medir la actividad de HMGCR total, se tomaron alícuotas de la suspensión microsomal conteniendo 50 a 150µg de proteína, se adicionaron 10µl de HMG-CoA 3,3mM y 90µl de una solución de cofactores (buffer fosfato: K₂HPO₄ 1M y KH₂PO₄ 1M (pH= 7.4); EDTA sódico 20mM; DTT 10mM). El ensayo se inició con la adición de NADPH a una concentración final de 100µM. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 200 µl. Paralelamente se realizó un blanco de microsomas para cada muestra, donde no se adicionó HMG-CoA.

Se incubaron las muestras con sus respectivos blancos durante 30 min a 37°C en una placa multiposillo y se midió la absorbancia cada 30 seg en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

La actividad de HMGCR fue expresada en pmoles de NADPH consumidos / mg de proteína microsomal / min.

II.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

II.5.1. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA CUANTIFICAR HMGCR Y SREBP-2

Esta metodología tiene como objetivo separar fracción citoplasmática (para detectar HMGCR) y fracción nuclear (para detectar SREBP₂ maduro). Para lo cual se utilizó Nonidet NP al 10% (Tergitol), capaz de lisar la membrana plasmática dejando intacta la membrana nuclear, para luego obtener el extracto nuclear por shock osmótico (Schreiber y col. 1989).

Para la obtención de dichas fracciones se homogeneizaron mecánicamente 0.15 gr de tejido (hígado y/o tumor extraídos en la necropsia) con buffer A (Tabla II.2). Luego se dejó en reposo a 0°C durante 15 min, se adicionó Nonidet NP- 40 al 10%, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 x g a 4°C, 15 min. Se colectó en el sobrenadante el contenido citoplasmático, fraccionándolo y guardándolo a - 80°C hasta el momento de su análisis. Finalmente se resuspendió el pellet nuclear en Buffer B (Tabla II.3), se homogeneizó mecánicamente y se centrifugó a 96.000 x g a 4°C 60 min para obtener el extracto nuclear, almacenado también a -80°C hasta el momento de su análisis.

Tabla II.2. Buffer A

	Concentración
HEPES (pH=7.9)	10mM
KCl	10mM
MgCl ₂	1.5mM
EGTA	0.1mM
EDTA	0.1mM
PMSF	0.5mM
DTT	1mM
Inhibidor de proteasa (Sigma)	0.01% (v/v)

Tabla II.3. Buffer B

	Concentración
HEPES (pH=7.9)	20mM
NaCl	0.4M
MgCl ₂	1.5mM
EGTA	1mM
EDTA	1mM
PMSF	1mM
DTT	1mM
Inhibidor de proteasa (Sigma)	0.01 % (v/v)

II.5.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

II.5.2.a. *Método de Lowry:*

Se basa en el desarrollo de un cromóforo de color azul-violáceo que detecta grupos aromáticos de los aminoácidos con el reactivo de Folin en medio alcalino (Lowry y col. 1951).

Composición de soluciones utilizadas:

- Solución A: Se disuelven 20 gr de Na_2CO_3 con 4 gr de NaOH en H_2O destilada, volumen final: 1 litro.
- Solución B1: Tartrato mixto de potasio y sodio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 2.7% p/v en agua bidestilada.
- Solución B2: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% p/v en agua bidestilada.
- Solución "C": Se mezclaron la solución B1 y A y finalmente se agregó solución B2, en una proporción (100:1:1).

Se incubaron las alícuotas correspondientes al estándar de albúmina sérica bovina (ASB) y de muestra con solución "C" (detallada abajo) durante 15 min a temperatura ambiente, lográndose así la digestión proteica. Luego se adicionó a cada mezcla de reacción 50 μl de reactivo de Folin (dilución 1/2), se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente 30 min para el desarrollo de color. La D.O. se midió a 750 nm contra blanco (mezcla de reacción que se preparó en conjunto con las muestras a determinar) en un espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 (Sydney, Australia).

La concentración de proteínas en cada una de las muestras evaluadas se obtuvo por extrapolación con los valores arrojados por la curva estándar.

II.5.2.b. *Método de Bradford:*

La unión del Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas provoca un cambio en el pico de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm, de modo que calculando la D.O. a 595 nm con un blanco de reactivo (sin proteína) se puede calcular la concentración proteica de la muestra problema por comparación con la D.O. de una curva estándar, de concentraciones conocidas. El complejo colorante-proteína tiene un coeficiente de extinción tal que confiere gran sensibilidad al método. A su vez, el complejo se establece muy rápidamente, en sólo 1-2 minutos, y permanece disperso en solución por una hora (Bradford 1976).

Composición de soluciones utilizadas:

- Reactivo de Bradford: Coomassie Brilliant Blue G-250 0.01% p/v en etanol 4.70% y ácido fosfórico (H_3PO_4) 8.50% en agua bidestilada.

Se realizó una curva de calibración en placas de 96 multipocillos donde se adicionaron 5 μ l de soluciones de ASB de diferentes concentraciones (0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 y 1 μ g/ μ l) y 250 μ l de reactivo de Bradford en cada pocillo. Asimismo se incubaron 5 μ l de la muestra problema con 250 μ l del reactivo. Luego se midió la D.O. a 595 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, calculándose por extrapolación de la calibración el contenido proteico de cada muestra.

II.5.3. DETERMINACIÓN DE HMGCR Y SREBP-2 POR WESTERN BLOT

II.5.3.a. *Electroforesis:*

En una cámara de electroforesis Mini-Protean II, se llevó a cabo la corrida de geles de poliacrilamida al 12.5% con dodecil sulfato de sodio (SDS) como agente desnaturalizante (PAGE-SDS) en presencia de un amortiguador Tris-Glicina-SDS

pH=8.3 (Tris 0.025M; Glicina 0.2M y SDS 3.5mM). Las muestras de los microsomas aislados de hígado (obtenidos como se detalla en inciso II.4.1), de las fracciones citoplasmáticas y del extracto nuclear de hígado y/o tumor, (80-100 µg de proteína total / calle) se sembraron y se desplazaron a través del gel durante 2 h a 120 V. Previo a la carga de las muestras en el gel, las mismas se incubaron 10 min a 95°C en una solución de TRIS-HCl 0.5M (pH=6.8) SDS 10%; β-mercaptoetanol 1%; azul de bromofenol 0.5% y glicerol 15% para una desnaturalización total. Finalizada la corrida, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Hybond-P PVDF Membrane, Amersham Pharmacia Biotech) como se detalla a continuación.

II.5.3.b. Transferencia semi-seca:

Se activó la membrana con metanol 100% por 1 min. La membrana y papeles secantes se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 0.05M, Glicina 0.04M, Metanol 0.2% p/v) por 30 min a temperatura ambiente. Por último se llevó a cabo transferencia en un equipo semi-seco (Bio-Rad). Para esto, se colocó un papel humedecido con el buffer de transferencia sobre el ánodo, sobre éste se colocó la membrana, el gel y otro papel secante humedecido. Finalmente, se colocó el cátodo y se llevó a cabo la corrida a 10 V por 30 min. Una vez finalizado el proceso, el gel se tiñó con azul de Coomasie R-250 con el fin de evidenciar la transferencia.

II.5.3.c. Bloqueo e incubación con anticuerpo:

Teniendo como objetivo bloquear las uniones no específicas del anticuerpo a la membrana, se incubó la misma en buffer PBST (NaCl 137mM; KCl 2.7mM; Na₂HPO₄ 10.0mM; KH₂PO₄ 2.0mM; Tween 20 0,05M; pH=7.4) con leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C.

Luego de lavar la membrana con buffer PBST (3 veces x 15 min cada vez) se incubó con el anticuerpo primario específico para cada proteína (HMGCR, SREBP-2 o β-

Actina utilizada como control de carga), diluido en solución de PBST con leche descremada al 3% (solución de incubación). Posteriormente, se lavó nuevamente con PBST (3 x 15 min) y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa, disuelto en solución de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan tres nuevos lavados con PBST por 15 min cada uno a temperatura ambiente.

Anticuerpos utilizados:

- HMGCR (H-300): sc-33827. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- SREBP-2 (1C6): sc-13552. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Goat anti-mouse IgG-HRP: sc 2055. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Monoclonal Anti- β -Actin (mouse IgG-1 isotype), AC-15. Sigma-Aldrich.

II.5.3.d. Revelado:

La visualización de las bandas inmunoreactivas se realizó por quimioluminiscencia con los reactivos luminol y cumárico (enhanced chemiluminescence, ECL detection, Amersham Pharmacia Biotech) y autorradiografía.

II.5.4. AISLAMIENTO DE MEMBRANA PLASMÁTICA TUMORAL

Se obtuvieron fracciones de membrana plasmática (MP) utilizando la técnica de Mander y col. (1994) con algunas modificaciones. Se homogeneizó el tejido en buffer de lisis (Sacarosa 0.25M, Hepes 10mM, EDTA 1mM, pH=7.4), se centrifugó a 15000 x g por 15 min. Paralelamente se elaboró manualmente un gradiente de Nicodenz-ficoll, para lo cual se adicionó una solución de Nicodenz 45% continuando por un gradiente de ficoll 1-22%. El sobrenadante del homogenado se sembró por encima del gradiente y se centrifugó en una ultracentrífuga L8.70 M a 238000 x g, utilizando el rotor SW60 Ti rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA) durante 16 h a

4°C. Se colectaron fracciones de 200µl del gradiente y se midió la cantidad de proteína de cada fracción por el método de Bradford según se detalla en ítem II.5.2.b, se juntaron las alícuotas pertenecientes a la MP que generan un pico de proteínas característico entre las fracciones 8 y 11.

II.5.5. DETERMINACIÓN DE RAS TOTAL Y EN MEMBRANA PLASMÁTICA

Muestras de citoplasma obtenidas como de detalla en el inciso II.5.1. y las fracciones correspondientes a la MP como de detalla en el inciso II.5.5. se analizaron por western-blot. Para el inmunoblotting se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-panRas (Calbiochem), capaz de detectar todas las isoformas de la proteína Ras (K, N y H-Ras). Se utilizaron distintos controles de carga: para las muestras de citoplasma se realizó inmunoblotting de β -actina y para las muestras de membrana plasmática se tiñó la membrana de PVDF con Coomassie blue.

II.6. IDENTIFICACION DE PROTEINAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA MALDI-TOF

Se llevó a cabo la identificación de las proteínas contenidas en la banda correspondiente a SREBP-2. Se corrió un gel unidimensional como se describe en II.5.3.a. Se tiñó el gel con Coomasie Coloidal (Coomasie blue G-250 al 2% p/v en agua miliQ) como se detalla a continuación:

- Fijación del gel en solución 1 (etanol 30% v/v, H_3PO_4 2% v/v) 30 min, tres veces
- Lavado con H_3PO_4 al 2% v/v 20 min, tres veces
- Fijación con 15ml en solución 2 ($(NH_4)_2SO_4$ 15 % p/v, H_3PO_4 al 2% v/v, etanol 20% v/v) durante 30 min
- Agregado de 0.225ml de Coomasie blue G-250 al 2% p/v por 24h
- Lavar con H_2O miliQ

Finalmente se cortó la banda correspondiente a SREBP-2 según el peso molecular al que se evidenció la unión a los anticuerpos, se colocó en un tubo y

se envió a caracterizar al “Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF” (CEQUIBIEM).

II.7. METODOLOGÍA ESPECÍFICA PARA CUANTIFICAR ARNm POR REAL TIME RT-PCR

II.7.1. OBTENCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN alícuotas (0.2gr) de hígado se trataron con 1ml de trizol TRI (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH), se les adicionó 200µl de cloroformo, se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a tubos nuevos estériles y se adicionaron 500 µl de isopropanol, se mezclaron por inversión y se dejaron a temperatura ambiente durante 10-15 min. Luego se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa fue removida y al precipitado de ARN se lo lavó con 900µl de etanol al 75%. Esta solución se centrifugó a 7.500 x g durante 5 min a 4°C, el etanol fue removido (este lavado se repitió tres veces) y, finalmente, el ARN precipitado se disolvió en agua miliQ estéril. Se determinó la concentración de ARN leyendo la absorbancia a 260nm y la relación A^{260}/A^{280} para chequear el grado de pureza del ARN aislado (respecto a la presencia de proteínas).

La calidad del ARN se verificó en un gel de agarosa desnaturalizante: Agarosa 1%, Formaldehído 0,8% v/v, Mops 0,42% p/v y Syber Green o Bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) al 0,01%. Se comparó el peso de las bandas observadas con luz UV con un estándar de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Life Technologies).

Las muestras de ARN fueron tratadas con desoxirribonucleasa I (DNAsa I, Fermentas Life Sciences), para eliminar contaminantes de ADN. Se incubaron 3µl del ARN obtenido con 1 µl de DNAsa I en buffer provisto por el kit a 37 °C por 30 min. Luego se agregó 0.5µl de EDTA 50mM y se incubó a 65 °C por 10 min.

II.7.2. OBTENCIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

El ADN complementario (ADNc) fue obtenido por transcripción reversa utilizando un *kit* comercial qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences, Inc). Se incubaron según protocolo 5 µl del ARN obtenido del proceso de purificación descrito en ítem anterior, obteniendo un volumen final de 20 µl de reacción. Luego de una centrifugación rápida, las muestras fueron llevadas a las siguientes condiciones de temperatura: 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos y 85°C por 5 minutos en un termociclador (Thermo Hybaid PCR Express).

II.7.3. DISEÑO DE LOS CEBADORES

Se utilizaron los programas ASePCR y Unipro UGENE 1.1. Para cada uno de los genes a estudiar, se eligieron secuencias de nucleótidos que delimiten segmentos del orden de los 100 a 200 pb, pero que la secuencia delimitada por dichos cebadores en el ADN genómico tuviese al menos un intrón intercalado para detectar si hubiera amplicones de ADN genómico contaminante que resultarían en un tamaño mayor al esperado. Otras premisas que se tuvieron en cuenta al momento de diseñar los cebadores fueron su longitud (entre 19 a 23 pb), su proporción de nucleótidos G y C (del orden del 55-60%), su temperatura de fusión (T_f) (entre 60-65°C) y que la misma no difiera más de 2°C entre los primers (directo-F- y reverso-R-) diseñados.

Los cebadores específicos para cada uno de los genes evaluados en el presente trabajo son listados en la tabla II.4, donde se indican sus secuencias, sus longitudes y los tamaños de los productos esperados.

Tabla II.4. Cebadores

Primer	Secuencia (5'→3')	Longitud (pb)	Tamaño amplicón (pb)
HMGCR-F	TGTCCTTGATGGCAGCCTTG	20	142
HMGCR-R	CGCGCTTCAGTTCAGTGTCAG	21	142
LDLR-F	GCAGTAGCTCGCTCTCGTTG	20	125
LDLR-R	TGGCAATGGATCCCGGAAAG	20	125
SREBP2-F	AAGGCTGGCCCATAGCTTC	19	192
SREBP2-R	GCAGTAGCTCGCTCTCGTTG	20	192
Actina-F	TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG	23	104
Actina-R	CTCCTGCTTGCTGATCCACA	20	104
ARNr-F	GTAACCCGTTGAACCCCAT	20	151
ARNr-R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	20	151

II.7.4. CHEQUEO DE RETROTRANSCRIPCIÓN Y DE AMPLICONES

Con el objetivo de corroborar una óptima transcripción reversa y la correcta adhesión de los cebadores o primers diseñados (II.7.3), así como el tamaño de los amplicones obtenidos, se llevó a cabo la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando reactivos Inbio-Highway.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

- H ₂ O	13.85µl
- Buffer 10X	2.5µl
- Mg (25nM)	2.5µl
- dNTPs (10nM)	2.5µl
- Primers (12.525pmol/µl)	1µl
- ADNc (250300ng/µl)	2.5µl
- Taq polimerasa	0.15µl

Las condiciones de incubación de la PCR fueron: un ciclo a 94 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 40 seg, 57 °C por 40 seg y 72 °C por 40 seg y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 min.

El tamaño de los amplicones obtenidos se corroboró en un gel de agarosa al 2%, con el agregado de un colorante Sybr-Green para visualizar las bandas de ADN a la luz UV. Se comparó el peso de las mismas con un patrón de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

II.7.5. AMPLIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DEL ADNc

Para realizar la amplificación de los transcritos de los genes de HMGCR, LDLR, SREBP-2 y actina (gen de referencia) se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-PCR) (Heid y col. 1996). La reacción fue optimizada para cada uno de los diferentes pares de cebadores y muestras de ADNc.

Componentes utilizados en la reacción:

- ADNc (60-150ng/μl)	6μl
- PerfeCta SYBR Green Super Mix (2X)	12μl
- Primers F + R (10-25pmol/μl) *	1.8μl
- H ₂ O miliQ estéril	4.2μl

*Primer F (forward): cebador directo

*Primer R (reverse): cebador reverso

El programa de temperaturas utilizado en el termociclador Stratagene MX30005P fue: 94°C por 4 min, 40 ciclos a 94°C por 40 seg, 57°C por 40 seg y 72 °C por 40 seg y finalmente un ciclo a 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 95 °C por 30 seg.

La cantidad relativa de ARNm se calculó utilizando el programa qBase v 1.3.5.

II.8. METODOLOGÍA PARA DETERMINAR APOPTOSIS TUMORAL

II.8.1. OBTENCIÓN DE LOS CORTES DE TEJIDO TUMORAL

El tumor de células A549 crecido subcutáneamente se sumergió en formol tamponado al 10% (formol 10%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.029M, Na_2HPO_4 0.046M) durante 24 h para su fijación.

Se procedió al armado del taco de parafina de la siguiente manera:

- Se deshidrató el tejido por inmersión en concentraciones crecientes de etanol (50%, 75%, 90% y 100%) y finalmente en xilol (dos veces). Todas las incubaciones fueron de 1h.
- Se realizó la inclusión en parafina colocando el tejido en los soportes correspondientes conteniendo parafina fundida y se mantuvo en estufa a 60°C , al menos 3h.
- Se dejaron enfriar las muestras y se guardaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Se realizaron cortes de un espesor de $3 \mu\text{m}$ aproximadamente y se colectaron en portaobjetos con carga positiva.

II.8.2. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE EL ENSAYO DE TUNEL

Este método permite identificar apoptosis celular en un tejido ya que las células apoptóticas poseen su ADN fragmentado y por lo tanto con numerosos extremos 3'-OH libres, debido a la acción de endonucleasas activadas durante dicho proceso. Se emplea la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para adosar deoxinucleótidos tri-fosfato (dUTP) marcados con un fluorocromo (rodamina) a los fragmentos de ADN con terminales 3'-OH. De esta manera, se pueden evaluar al microscopio de fluorescencia los núcleos apoptóticos en un corte de tejido.

Se desparafinó el corte de tejido sumergiéndolo primero en xilol, luego en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%) y finalmente en PBS (NaCl

0.13M, KCl 2.6mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1.5mM). Una vez, eliminado el excedente de líquido con papel adsorbente se permeabilizó la muestra con 20µg/ml de proteinasa K (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a la incubación durante 1h a 37°C con la enzima y los dUTP marcados provistos por el *kit* comercial para detección *in situ* de muerte celular (Roche). Conjuntamente se hicieron los controles negativos (sin enzima) y positivos (cortes previamente tratados con DNAsa (Invitrogen) durante 10 min a 37°C).

Una vez finalizada la reacción, los cortes se lavaron con PBS y se montaron con medio de montaje con el colorante fluorescente diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen) como marcador nuclear.

Las células TUNel positivas se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Tokio, Japón), adosado a una cámara digital Olympus DP70 y se contaron con el software ImagePro Plus (IPPTM) v5.1 image analysis software (Media Cynernetics, Silver Spring, MA). Para la cuantificación se tomaron aleatoriamente imágenes de diez campos para cada situación experimental (aumento 400X) y los resultados se expresaron como porcentaje de células TUNEL positivas respecto al número total de células.

II.8.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

La actividad de esta enzima se midió con un *kit* colorimétrico para determinar actividad de caspasa-3 (Sigma). El ensayo se basa en la hidrólisis de un péptido sintético que oficia de sustrato selectivo de Caspasa-3, acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilina (Ac-DEVD-pNA), resultando en la liberación de p-Nitroanilina (p-NA) que presenta un pico de absorción a 405nm.

Se obtuvieron los extractos citosólicos por homogenización de 0.2 mg de tejido con 300µl de buffer de lisis (provisto por el *Kit*) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 50mM para inhibir proteólisis por serín proteasas. Se centrifugó el homogenado a 20000 \times g por 15 min a 4°C. El sobrenadante (extracto

citósolico) se utilizó para medir la actividad de caspasa-3. Se colocaron 5µl de cada muestra en tres pocillos de una placa multipocillo de 96 y a uno de ellos se le adicionó 10µl de inhibidor de caspasa para cuantificar lisis inespecífica (por enzimas que no sean caspasas). Luego se llevó a un volumen final de 90µl con buffer de ensayo (provisto por el *kit*). Paralelamente se colocaron (por duplicado) 5µl de Caspasa-3 200µM (control positivo), con y sin inhibidor y fueron llevados también a 90µl finales. Se agregó además un blanco de reacción conteniendo sólo 90µl buffer de reacción. Se inició la reacción adicionando 10µl de sustrato a todos los pocillos y se incubó toda la noche a 37°C. Se leyó la densidad óptica a 405nm en el lector de placas mencionado anteriormente. La actividad específica de caspasa-3 se calculó como: µmol de p-NA / mg de proteína / hora.

II.9. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza) o test "t" (Student) según sea pertinente, empleando un software de GB-STAT Professional Statistics Program (version 4.0) de Dynamic Microsystems Inc. (Silver Springs, MD., USA). Los gráficos se realizaron utilizando el programa Sigma Plot Scientific Graphing Software (version 10.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO. USA). El análisis de imagen se efectuó por medio del software "Image J" o "ImagePro Plus", según correspondiera.

II.10. BIOÉTICA

Los experimentos se realizaron según las directrices de manejo del Animal de Laboratorio de Wolfensohn y Lloyd (2013). Los protocolos de uso de los animales empleados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas UNLP. Protocolo número: 04-001-13.

III

Efecto del geraniol sobre el
metabolismo lipídico

III.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

Animales NIH nu/nu de aproximadamente un mes de edad, fueron mantenidos en nuestro bioterio como se describe en Materiales y Métodos (ítem II.2.1). Al cumplir las 8 semanas de edad los animales se dividieron en un grupo control y en tres grupos experimentales, cada uno de los cuales recibió una dieta suplementada con cantidades crecientes de geraniol (25, 50, 75 mmol de G / Kg dieta). El tratamiento se prolongó por 21 días, en los cuales se monitoreó el peso y la ingesta de alimento y agua de los animales. Tres horas previas al sacrificio se les inyectaron por vía intraperitoneal 25 μ Ci de [¹⁴C] acetato. Se determinó colesterol, triglicéridos y G plasmático (II.3.6, II.3.7 y II.3.8). En hígado se evaluó contenido de colesterol (libre y esterificado) y de triglicéridos (II.3.1, II.3.2), la incorporación de [¹⁴C]acetato en colesterol y precursores, en ácidos grasos y en lípidos totales (II.3.4). Se cuantificaron los niveles proteicos y la actividad de HMGCR en microsomas de hígado aislados (II.5.3 y II.4.2). A su vez, se midió el ARNm de HMGCR, LDLR y SREBP-2 de hígado (sección II.7).

III.2. RESULTADOS

III.2.1. DOSIS DE GERANIOL

Periódicamente se cambió el alimento con el suministro de G correspondiente y se midieron los gramos de alimento que fueron ingiriendo los animales en el curso del tratamiento. Se determinó entonces, la dosis de G ingerida siendo 0.099 ± 0.006 ; 0.201 ± 0.013 y 0.291 ± 0.017 mmol G / ratón / día para 25, 50 y 75 mmol G / Kg de dieta respectivamente (figura III.1).

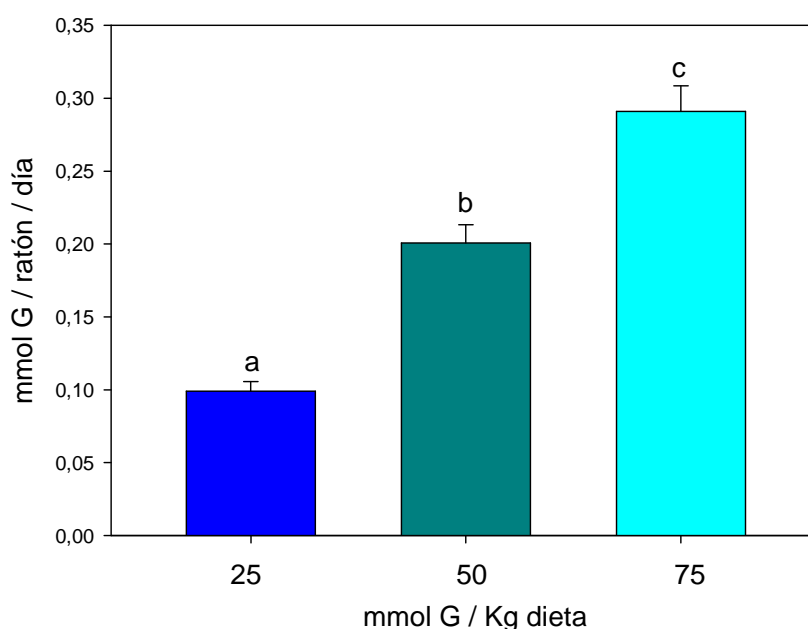


Figura III.1. Dosis de G. Los animales recibieron dietas suplementadas con cantidades crecientes de G; se calculó la dosis real promedio ingerida por ratón por día de acuerdo a la cantidad de alimento consumido por cada grupo a lo largo del tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 8 determinaciones. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dosis.

III.2.2. TOXICIDAD DEL GERANIOL

Como se muestra en la Tabla III.1, luego del período experimental de 3 semanas, los pesos corporales finales y los niveles de la ingesta de alimentos de ratones

alimentados con las tres dosis de G, no fueron significativamente diferentes de los ratones controles. El peso del hígado de ratones tratados con todas las dosis de G ensayadas tampoco fueron significativamente diferentes a los controles como se muestra en la relación peso corporal/peso del hígado. Esto muestra que el G, a las dosis utilizadas, no es tóxico, ya que no se observaron cambios en los parámetros mencionados debido al tratamiento como se observa comúnmente en animales sometidos a compuestos con cierta toxicidad (Wang y col. 2007).

Tabla III.1. Efecto del G en el peso corporal, el peso del hígado y en la ingesta de alimentos

	Control	25	50	75
		mmol G / Kg dieta		
PC inicial, g	20.5 ± 0.4	20.6 ± 0.2	21.0 ± 0.4	20.78±0.41
PC final, g	25.0± 0.5	24.03±0.46	24.54±0.20	24.08±0.41
PH, g	1.64±0.07	1.56±0,06	1.60±0.05	1.52±0.06
PH / PC	0.064 ±0.002	0.065±0.002	0.065±0.002	0.063±0.002
Alimento ingerido, g/día	4.10 ± 0.26	3.96 ± 0.26	4.02±0.25	3.88±0.23

Luego de tres semanas de tratamiento con G (0, 25, 50 y 75 mmol dieta G/ kg) se midió el peso corporal (PC) y el peso del hígado (PH) en los animales. Los valores representan la media ± SEM (n = 5). Los valores obtenidos para cada parámetro evaluado no difieren significativamente entre las dosis ensayadas ($p > 0,05$)

III.2.3. CONCENTRACIÓN DE GERANIOL EN SANGRE

Luego de 21 días de haber recibido la dosis de G correspondiente (0, 25, 50 o 75 mmol G / Kg dieta), los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca. Alícuotas (200-300µl) de sangre entera se colectaron con anticoagulante en viales herméticamente cerrados para determinar la concentración de G por CGC-MS como se describe en el ítem

II.3.8. Pese al bajo límite de detección del método (20ng), la concentración de G sanguínea fue muy baja y no logró detectarse.

III.2.4. COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS PLASMÁTICOS

Alícuotas de sangre, obtenidas como se detalla en el inciso anterior, se utilizaron para determinar la concentración de colesterol y triglicéridos séricos. Para lo cual se separó el suero del paquete globular (II.3.5) y se hicieron las determinaciones mencionadas con los *kits* enzimáticos correspondientes como se detalla en el capítulo Materiales y Métodos.

El G mostró un efecto hipolipemiante, ya que se reduce tanto la colesterolemia como la trigliceridemia en animales tratados, siendo esta disminución significativa, en ambos casos, a partir de 50 mmol G / Kg de dieta.

La hipocolesterolemia provocada es leve, el colesterol sólo se reduce un 18.4% respecto al control para la mayor dosis. Sin embargo, la reducción en los niveles plasmáticos de TG es mucho mayor, llegando a disminuir hasta en un 58.5% (Figura III.2).

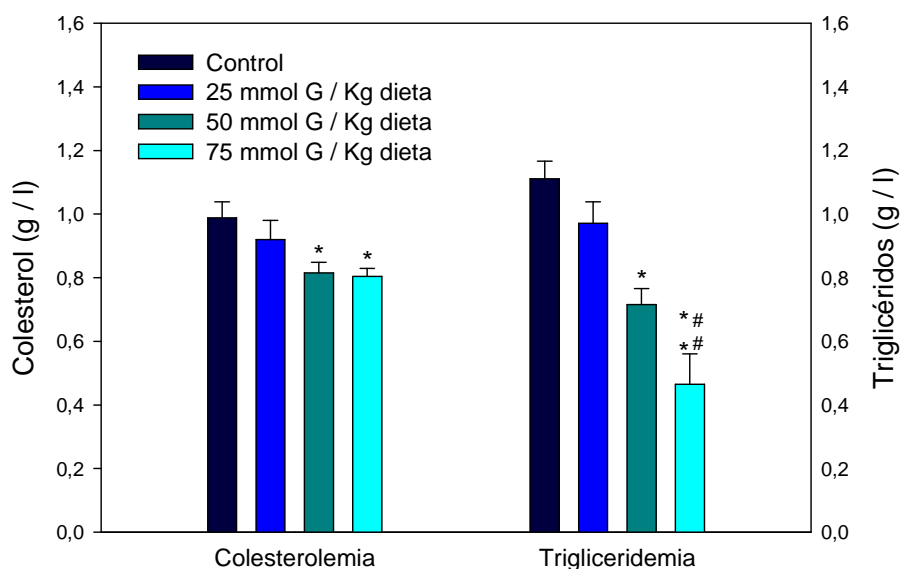


Figura III.2. Lípidos plasmáticos. Al finalizar el tratamiento con G (0, 25, 50 o 75 mmol / Kg dieta) se obtuvieron muestras de suero de los animales y se determinó colesterolemia y trigliceridemia. Los resultados se expresan como media \pm SEM, con $5 \leq n \leq 8$; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0,01$ respecto al grupo control; (##) $p < 0.01$ respecto al grupo tratado con 25 mmol G / Kg dieta.

III.2.5. COLESTEROL LIBRE, COLESTEROL ESTERIFICADO Y TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS

Se extrajeron los lípidos totales de hígado y luego de separarlos por cromatografía en capa fina (TLC), se carbonizó la placa y se cuantificó colesterol libre (CL), colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG). Si bien se observa una disminución de estos componentes en el plasma, no se encontraron diferencias significativas en el contenido lipídico hepático entre los ratones tratados y controles (Figura III.3).

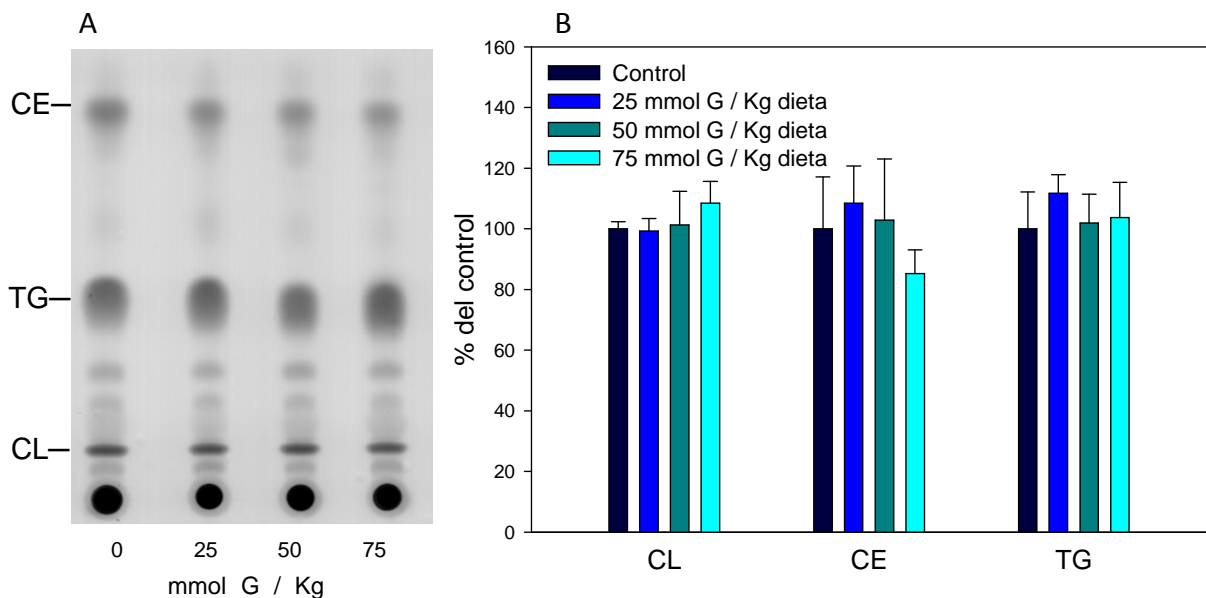


Figura III.3. Contenido lipídico hepático. Los lípidos del hígado se extrajeron y se separaron por TLC y la placa se reveló con $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ (A). Las cantidades relativas de colesterol libre (CL), colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG) fueron cuantificados como se detalla en Materiales y Métodos (B). Los resultados se expresan como media \pm SEM, n = 5.

III.2.6. INCORPORACIÓN DE $[^{14}\text{C}]$ ACETATO

Se evaluó la síntesis lipídica en hígado midiendo incorporación de $[^{14}\text{C}]$ acetato en lípidos totales (LT), ácidos grasos (AG) y lípidos insaponificables (LI). Según los resultados obtenidos (Figura III.4), se observa que dosis bajas de G (25 mmol G / Kg dieta) no disminuyen significativamente la incorporación de acetato en LT. Sin embargo, ésta se encuentra disminuida a partir de 50 mmol G / Kg dieta. La síntesis

de ácidos grasos está significativamente inhibida sólo con la dosis más alta de G mientras que la síntesis de la fracción de lípidos insaponificables demostró una importante inhibición frente al tratamiento con todas las dosis ensayadas. En este último caso las tres dosis utilizadas disminuyeron significativamente los niveles de radiactividad incorporada.

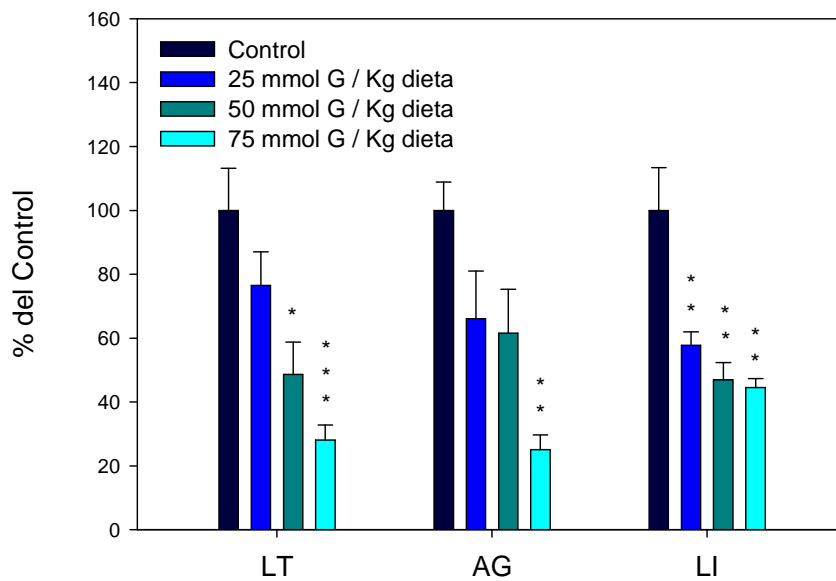


Figura III.4. Incorporación de acetato. Se inyectó [^{14}C]acetato tres horas previas al sacrificio de los ratones, se midió la incorporación de marca radioactiva en lípidos totales (LT), ácidos grasos (AG) y lípidos insaponificables (LI) de hígado. Los resultados se expresan como la media \pm SEM con $n=5$, (*) $p < 0,05$.

Al intentar cuantificar la incorporación de [^{14}C]acetato en intermediarios y productos finales de la VM separando los lípidos insaponificables por TLC, resultó que la radiactividad incorporada no fue suficiente como para ser cuantificada ni por exposición en una pantalla Storage Phosphor Screen GE-Healthcare, ni midiendo la radiactividad de cada componente del insaponificable extraído por raspado de la placa de TLC (según estándares sembrados en la misma placa) en contador de centelleo líquido.

III.2.7. EFECTO DEL GERANIOL SOBRE LA HMGCR DE HÍGADO DE RATÓN

Siendo la HMGCR la enzima limitante de la VM, se obtuvieron microsomas hepáticos con una alta integridad proteica verificada en geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie blue (Figura III.5).

La cantidad de HMGCR determinada partir de las bandas inmunoreactivas obtenidas por westernblot (Figura III.6.A) demostraron un reducción en los niveles de la proteína que oscilan entre un 20 y un 33%, aunque por razones metodológicas no ha sido posible determinar el grado de significancia estadística de esta reducción. Por el contrario, al evaluar la actividad de la enzima se observó una inhibición estadísticamente significativa a partir de 50 mmol G / Kg de dieta (Figura III.6.B), siendo este efecto mucho más marcado que la reducción en los niveles proteicos de HMGCR, alcanzándose una disminución de la actividad del 72% para la dosis más alta, que no sólo es significativa respecto al control, sino también en comparación con la menor dosis ensayada.

Paralelamente, se extrajo el ARNm total del hígado (Figura III.7.A), del cual se obtuvo por retrotranscripción el ADNc. Se verificó la eficacia del sistema de amplificación del gen de HMGCR mediante una PCR cualitativa (Figura III.7.B). La posterior cuantificación relativa del ARNm de HMGCR de por real time RT-PCR (Figura III.7.C y III.7.D) mostró que si bien la cantidad y la actividad de la enzima disminuyen conforme a la dosis de G suministrada, el ARNm de la misma se vio aumentado, siendo este aumento estadísticamente significativo para la dosis mayor (Figura III.6.C).

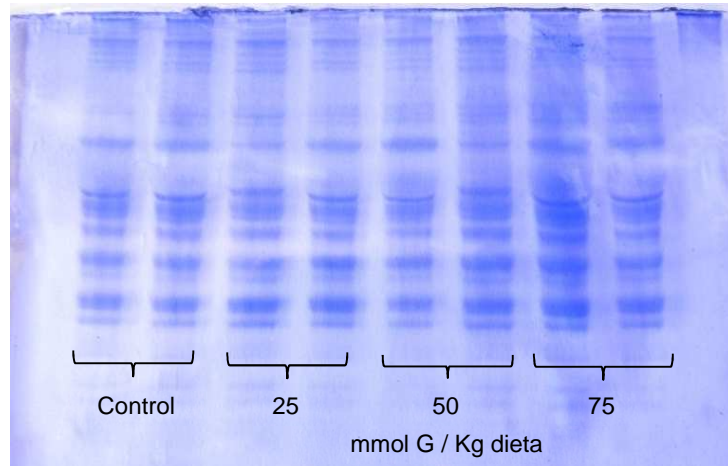


Figura III.5. Electroforesis de microsomos de hígado. Gel de poliacrilamida 12,5% con SDS teñido con Coomassie blue, se evidencian las calles donde se separaron las proteínas microsomas según su peso molecular.

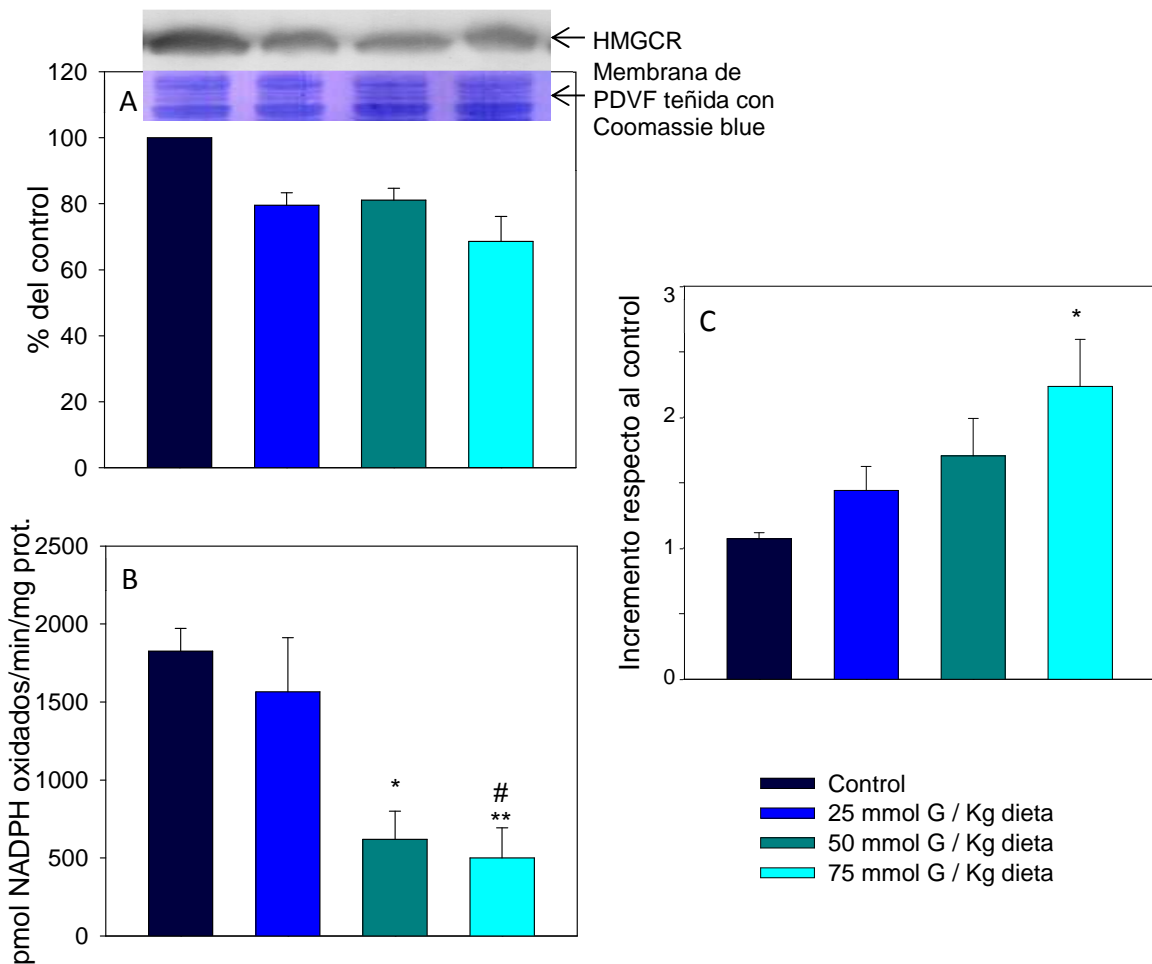


Figura III.6. Expresión de HMGCR. En microsomos hepáticos se determinaron los niveles proteicos (A) la actividad (B) y la expresión relativa del ARNm de HMGCR (C). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, con $n=4$; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ respecto al grupo control. (#) $p < 0.05$ respecto al grupo tratado con 25 mmol G / Kg de dieta.

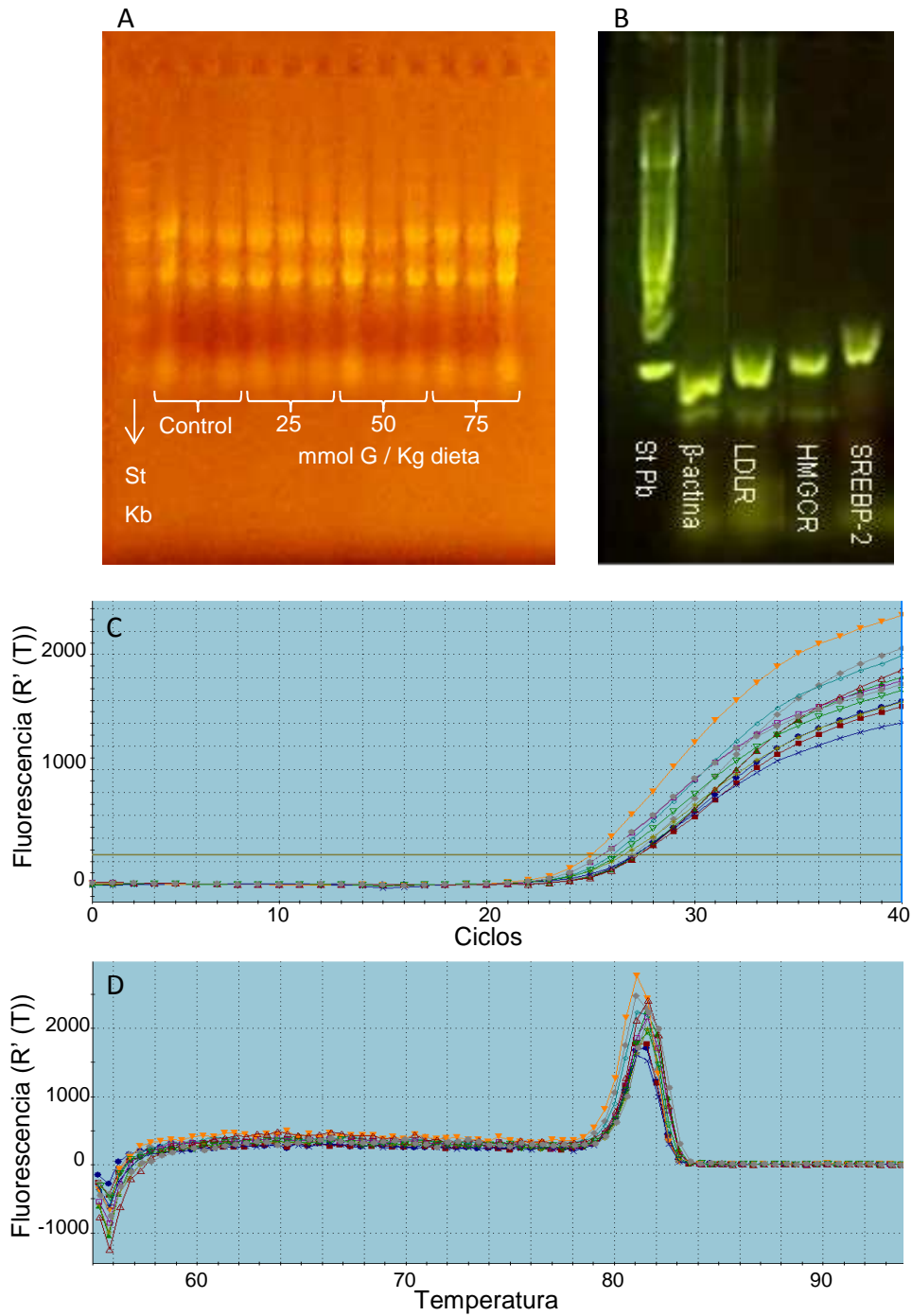


Figura III.7. Obtención y análisis del ARNm por RT-PCR. Se extrajo el ARN de hígado y se sembró en gel desnaturalizante para corroborar la calidad del mismo (A). Se obtuvo el ADNc, se amplificó con los primers para los genes de β -actina, LDLR, HMGCR y SREBP-2 y se chequearon los amplicones en gel de agarosa al 2% (B). Curvas de amplificación (C) y de disociación (D) de amplicones de HMGCR obtenidas por real time RT-PCR.

III.2.8. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LDL Y DE SREBP-2

Por último se midió en hígado la cantidad relativa del ARNm de LDLR y SREBP-2 por real time RT-PCR luego de verificar la eficacia del sistema de amplificación mediante una PCR cualitativa como se muestra en la Figura III.7.B. Los resultados mostraron que hay un aumento de la cantidad de ARNm del LDLR de una manera dosis dependiente, siendo significativo a partir de 50 mmol G / Kg dieta.

Por el contrario, en lo que respecta a la expresión de SREBP-2, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las tres dosis ensayadas (Figura III.8).

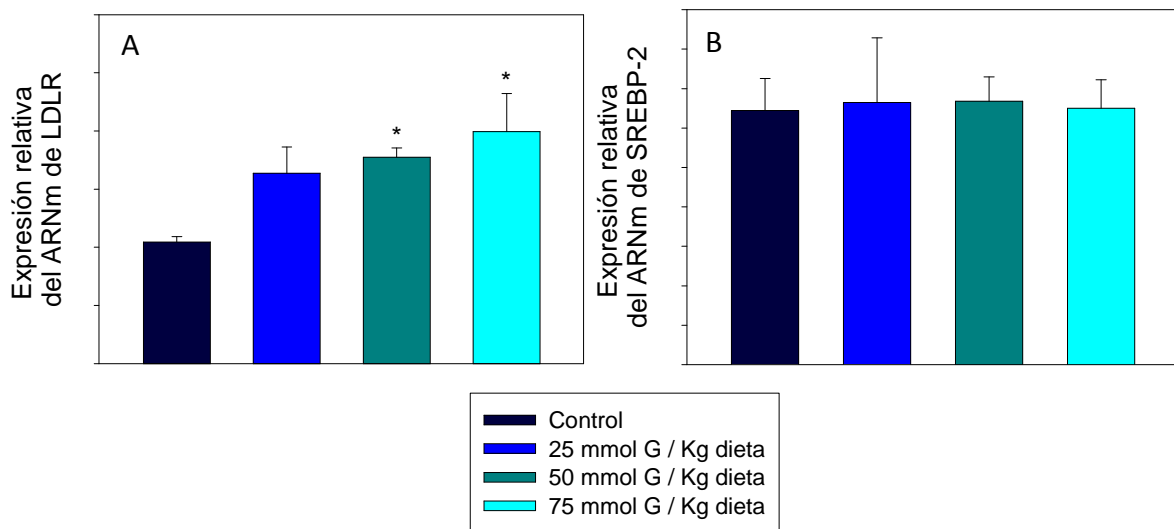


Figura III.8. Niveles de ARNm de LDLR y SREBP-2. Se obtuvo el ARNm de los hígados de ratones tratados con 0; 25; 50 o 75 mmol G / Kg de dieta. Se determinó la cantidad relativa del ARNm del LDLR (A) y del SREBP-2 (B). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, n=4; (*) $p < 0,05$ respecto al grupo control.

III.3. DISCUSIÓN

Los fármacos hipolipemiantes son de importancia crucial para evitar enfermedades cardiovasculares y mejorar la calidad de la vida cotidiana. A su vez, elevadas concentraciones de colesterol y TG plasmáticos constituyen uno de los mayores factores de riesgo para distintos tipos de enfermedades como aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, cálculos biliares, entre otras (Tabas 2002; Wolozin 2004; Maxfield y Tabas 2005; Després 2007). Numerosos estudios han indicado que una dieta adecuada y tratamiento farmacológico para lograr una óptima concentración de colesterol en sangre pueden reducir la morbilidad y la mortalidad por cardiopatía coronaria (Hu y Willett 2002; De Backer y col. 2003). Los agentes hipocolesterolemiantes más populares y comúnmente prescritos son las estatinas (Rallidis y col. 2007; Rozman y Monostory 2010), sin embargo, sus efectos colaterales asociados como reacciones musculares, hepáticas o complicaciones renales no pueden ser pasados por alto (Kapur y Musunur 2008; Sanossian y Ovbiagele 2008; Rozman y Monostory 2010). Debido a estos efectos secundarios se han buscado alternativas naturales (Karimi y col. 2010; Vallianou y col. 2011).

La escasa toxicidad del G ha favorecido su uso en la industria farmacéutica, y se han investigado ampliamente sus efectos como insecticida, repelente, antimicrobiano, antihelmíntico y agente antioxidante (Chen y Viljoen 2010). Nuestros estudios confirman que el G no resulta un compuesto tóxico a las dosis evaluadas ya que no produce efectos adversos apreciables en ratones NIH nude (Tabla III.1). Asimismo se ha descrito la capacidad de ciertos mamíferos y microorganismos de metabolizar el G (Chadha y Madyastha 1984; Demyttenaere y col. 2000; King y Dickinson 2000). Estos reportes sustentarían la inocuidad del G así como una posible explicación a la dificultad para detectar su concentración plasmática en los ratones tratados, aún con una técnica tan sensible (límite de detección de 10-30 ng) como la utilizada en nuestros ensayos.

Nuestros estudios demuestran que el G, tiene un efecto hipolipemiante ya que disminuye significativamente la trigliceridemia y colesterolemia a partir de 50 mmol G / Kg de dieta.

Debido a que el hígado tiene un rol primordial en la homeostasis del colesterol y en el metabolismo lipídico (Van der Wulp 2013), hemos evaluado los efectos del G particularmente en este órgano. Se demostró que en los ratones tratados con 50 y 75 mmol G / Kg dieta, la síntesis hepática de lípidos totales y especialmente de lípidos insaponificables disminuye significativamente con respecto a los ratones control (Figura III.4), siendo el colesterol el lípido insaponificable que se encuentra mayormente afectado según se demostró en ensayos *in vitro* en nuestro laboratorio (Polo y de Bravo 2006; Polo y col. 2011; Crespo y col. 2013). Estos resultados son muy alentadores para considerar al G como un potencial fitoquímico hipocolesteremiante, ya que sabiendo que aproximadamente el 50% del colesterol en humanos proviene de la síntesis de novo, una de las vías más efectivas de reducir sus niveles plasmáticos es indudablemente inhibir su síntesis endógena a nivel hepático (Vallianou y col. 2011).

Pese a la disminución en la cantidad de lípidos detectada en plasma (colesterol y TG) y a la inhibición de la síntesis de LI (colesterol y precursores) y AG en el hígado, el contenido lipídico (CL, CE y TG) en ese órgano no varía entre los ratones tratados y los controles (Figura III.3). Estos resultados sugieren un aumento en la incorporación y/o una disminución en la exportación de lípidos por parte del hígado. Teniendo en cuenta que las células de mamíferos adquieren el colesterol exógeno principalmente de las LDL vía el LDLR (Goldstein y Brown 1990), se midió la expresión hepática del ARNm del receptor y se observó un aumento estadísticamente significativo en los ratones tratados con las dosis más altas de G (Figura III.8). Estos resultados son acordes a lo observado con la colesterolemia que disminuyó significativamente en los animales tratados con las mismas dosis, por lo que se podría concluir que ese aumento en la expresión de los LDLR podría producir un incremento en la captación

de LDL y ser éste el mecanismo responsable de contribuir a la disminución de la cantidad de colesterol plasmático que se ha demostrado en estos ensayos.

Por otro lado, los isoprenoides han demostrado tanto en células normales como en células tumorales en cultivo, disminuir la expresión de la principal enzima reguladora de la vía de síntesis del colesterol, HMGCR, (Peffley y Gayen 2003; Mo y Elson 2004; Chung y col. 2008) proponiéndolo como uno de los múltiples efectos que estos compuestos parecen ejercer sobre esta vía metabólica y que aún no han sido específicamente dilucidados. Si bien son muy pocos los reportes del efecto del G sobre la HMGCR, se ha demostrado en células tumorales cultivadas *in vitro* una inhibición tanto transcripcional como postranscripcional de la enzima (Peffley y Gayen 2003; Crespo y col 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con los mecanismos propuestos tanto en la bibliografía como en trabajos previos en nuestro laboratorio (Crespo y col 2013) sugiriendo un mecanismo de inhibición postranscripcional, ya que en animales tratados con G la HMGCR en hígado demostró una disminución tanto de su actividad como de su cantidad mientras que la expresión de su ARNm se incrementa de una manera dosis dependiente (Figura III.6). Sumado a la modulación de la expresión de la enzima por G los resultados muestran una inhibición en la actividad enzimática que no se corresponde con la disminución en los niveles de HMGCR, lo que nos podría indicar que existe una inhibición directa del G sobre la actividad de la HMGCR. Apoyando esta teoría se ha propuesto la capacidad de G de unirse a esta proteína (Pattanayak y col. 2009). Sabiendo que la expresión del gen de HMGCR y de LDLR es regulado por SREBP-2 se evaluaron los niveles de su ARNm y no se observaron variaciones en los ratones tratados con ninguna de las tres dosis de G respecto a los animales controles (Figura III.8), posiblemente debido a que el G podría estar regulando, directa o indirectamente, el mecanismo de maduración de este factor de transcripción que involucra su clivaje en el retículo endoplásmico y migración al

núcleo (SREBP-2 maduro) y no necesariamente su transcripción (Wong y col. 2008; Crespo y col. 2013).

Si bien el efecto hipotrigliceridemiante fue descrito para otros terpenos y aceites esenciales de ciertas plantas (Karimi y col. 2010; Vallianou y col. 2011), el mecanismo por el cual producen este efecto no es claro. De acuerdo a nuestros resultados el G inhibe la síntesis de ácidos grasos (Figura III.4), con lo cual podríamos pensar en una inhibición de la enzima ácido graso sintetasa (FAS) como fue propuesto por Duncan y col. para los hepatocitos tratados con farnesol (Duncan y col. 2008). A su vez, al encontrar que sólo la dosis más alta de G produce una inhibición estadísticamente significativamente en la síntesis de ácidos grasos (Figura III.4) y que los TG plasmáticos ya se encuentran significativamente disminuidos en los ratones tratados con 50 mmol G / Kg de dieta (Figura III.2) consideramos que podrían existir otro/otros mecanismos de regulación del metabolismo de los ácidos grasos que estarían mediando la hipotrigliceridemia en ratones tratados con G. Se ha hipotetizado que este monoterpeno -directa o indirectamente- además de inhibir la lipogénesis, podría inducir la oxidación de los ácidos grasos, como ha sido reportado para otros intermediarios de la vía del mevalonato (Duncan y col. 2008).

Si bien hay estudios que abordan el efecto hipolipidémico y más aún el efecto antitumoral de distintos isoprenoides (Sebti y col. 1991; Mo y Elson 1999; Mo y Elson 2004; Ong y col. 2006; Chung y col. 2008; Duncan y col. 2008; Karimi y col. 2010; Vallianou y col. 2011), éste sería el primer reporte del efecto hipolipemiante *in vivo* del G como potencial agente nutracéutico.

IV

Efecto del geraniol sobre el
crecimiento tumoral

IV.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

Se implantaron 10^7 células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) en ratones NIH nu/nu de aproximadamente dos meses de edad, luego del desarrollo de los tumores, éstos se mantuvieron por repiques sucesivos como se detalla en Materiales y Métodos (ítem II.2.2).

Una vez desarrollado en los animales un tumor de tamaño medible (300mm^3 aproximadamente) se dividieron los ratones en cuatro lotes: un grupo control y tres grupos experimentales, cada uno de los cuales recibió una dieta suplementada con cantidades crecientes de G (25, 50 y 75 mmol de G / Kg dieta). El tratamiento se prolongó por tres semanas. Tres horas previas al sacrificio se les inyectaron (vía intraperitoneal) $25\mu\text{Ci}$ de $[^{14}\text{C}]$ acetato. Durante las semanas de tratamiento se realizaron periódicamente las medidas del volumen tumoral (II.2.3). Se midió el grado de apoptosis en los tumores obtenidos en la necropsia (sección II.8) y se cuantificaron los niveles de la proteína Ras en membrana y en homogenado de células tumorales (II.5.5).

Se determinó colesterol sérico (II.3.6). En hígado y en tumor se midió contenido de colesterol libre y esterificado (II.3.1), incorporación de $[^{14}\text{C}]$ acetato en lípidos insaponificables (colesterol y precursores), en ácidos grasos y en lípidos totales (II.3.4). Se cuantificaron también, los niveles de HMGCR y SREBP-2 en citoplasma y núcleo respectivamente (II.5.3).

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. CRECIMIENTO TUMORAL

Se evaluó el efecto de G en el progreso del tumor, midiendo en el curso del tratamiento (dos veces a la semana) el volumen tumoral (Figura IV.1). La suplementación dietética con G resultó en una disminución del crecimiento tumoral para las dosis mayores a partir de las dos semanas de tratamiento, sin haber diferencias significativas entre dosis. Se observó también, una disminución de crecimiento tumoral en los animales tratados con 25 mmol G / Kg de dieta hacia el final del tratamiento.

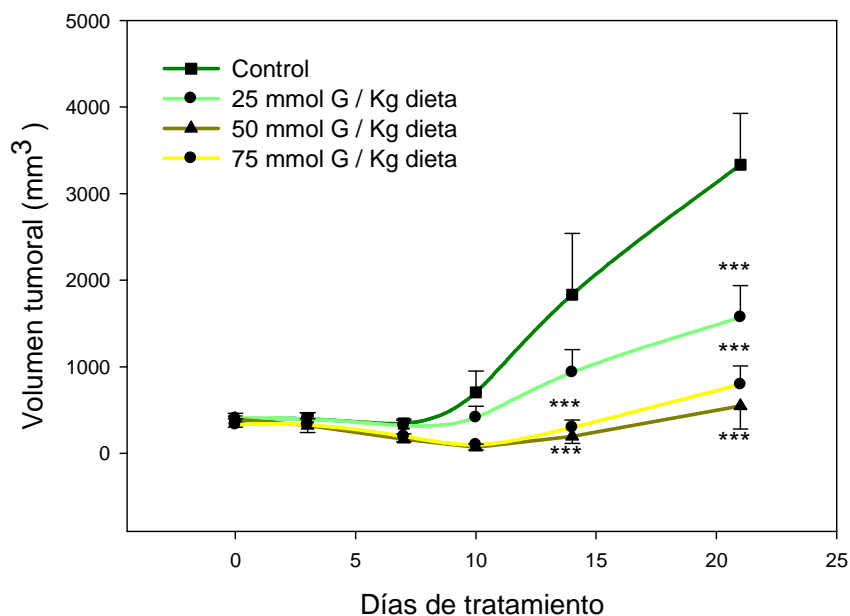


Figura IV.1. Crecimiento Tumoral. Ratones portadores de tumor, de 300 mm³ aproximadamente, fueron tratados con G (0, 25, 50 o 75 mmol G / Kg de dieta) durante tres semanas. Periódicamente se midió el tamaño tumoral. Los valores se expresan como la media de 5 animales \pm SEM. (***) $p < 0,001$.

IV.2.2. TOXICIDAD DEL GERANIOL

Se corroboró que el G no produjera efectos adversos en el animal midiendo el peso de hígado (PH), el peso corporal (PC) final y el peso corporal corregido por el peso que le aporta el tumor al animal (PC-PT). Para ninguno de los tres parámetros evaluados se observaron diferencias significativas entre los distintos lotes. Si bien hay una tendencia a disminuir el peso corporal con las crecientes dosis de G, esta tendencia desaparece al corregir el peso corporal sustrayendo el peso que aporta el tumor. En cambio, el peso del tumor (PT) final disminuyó con las dosis crecientes de G (tabla IV.1).

Tabla IV.1. Efecto de G en el crecimiento tumoral y el peso corporal y hepático

Lote	PC	PT	PC- PT	PH
Control	24.31 ± 1.08	2.64 ± 0.73	21.67 ± 0.27	1.68 ± 0.10
25 mmol G/ Kg dieta	25.06 ± 0.56	1.57 ± 0.36	23.49 ± 0.60	1.86 ± 0.11
50 mmol G/ Kg dieta	21.95 ± 1.55	0.55 ± 0.26*	21.98 ± 0.94	1.75 ± 0.07
75 mmol G/ Kg dieta	21.49 ± 0.81	0.79 ± 0.21*	20.70 ± 0.64	1.72 ± 0.07

Como control de toxicidad se evaluó el peso corporal final (PC), el peso corporal corregido (PC-PT) por el peso que aporta el tumor (PT) y el peso hepático (PH). Los valores se expresan como la media de 5 animales ± SEM. (*) p < 0.05 respecto al grupo control.

IV.2.3. APOPTOSIS

Con el objetivo de conocer los posibles mecanismos responsables de la disminución de crecimiento tumoral, se midió apoptosis en cortes histológicos de tumor por el método de TUNEL y cuantificando la actividad de Caspasa-3 (Figura IV.2). Ambas metodologías mostraron un aumento en la apoptosis celular estadísticamente significativa en los animales tratados con 50 y 75 mmol G / Kg dieta respecto no sólo al lote control sino también al que recibió la dosis más baja. Se observa para 50 mmol G / Kg dieta que el aumento tanto en las células TUNEL positivas como en la

actividad de Caspasa-3 es mayor que para la dosis más alta. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas dosis. Se determinó también apoptosis en los hepatocitos de ratón por el método de TUNEL mostrando no aumentar significativamente en éstas células con las dosis de G ensayadas (resultados no mostrados).

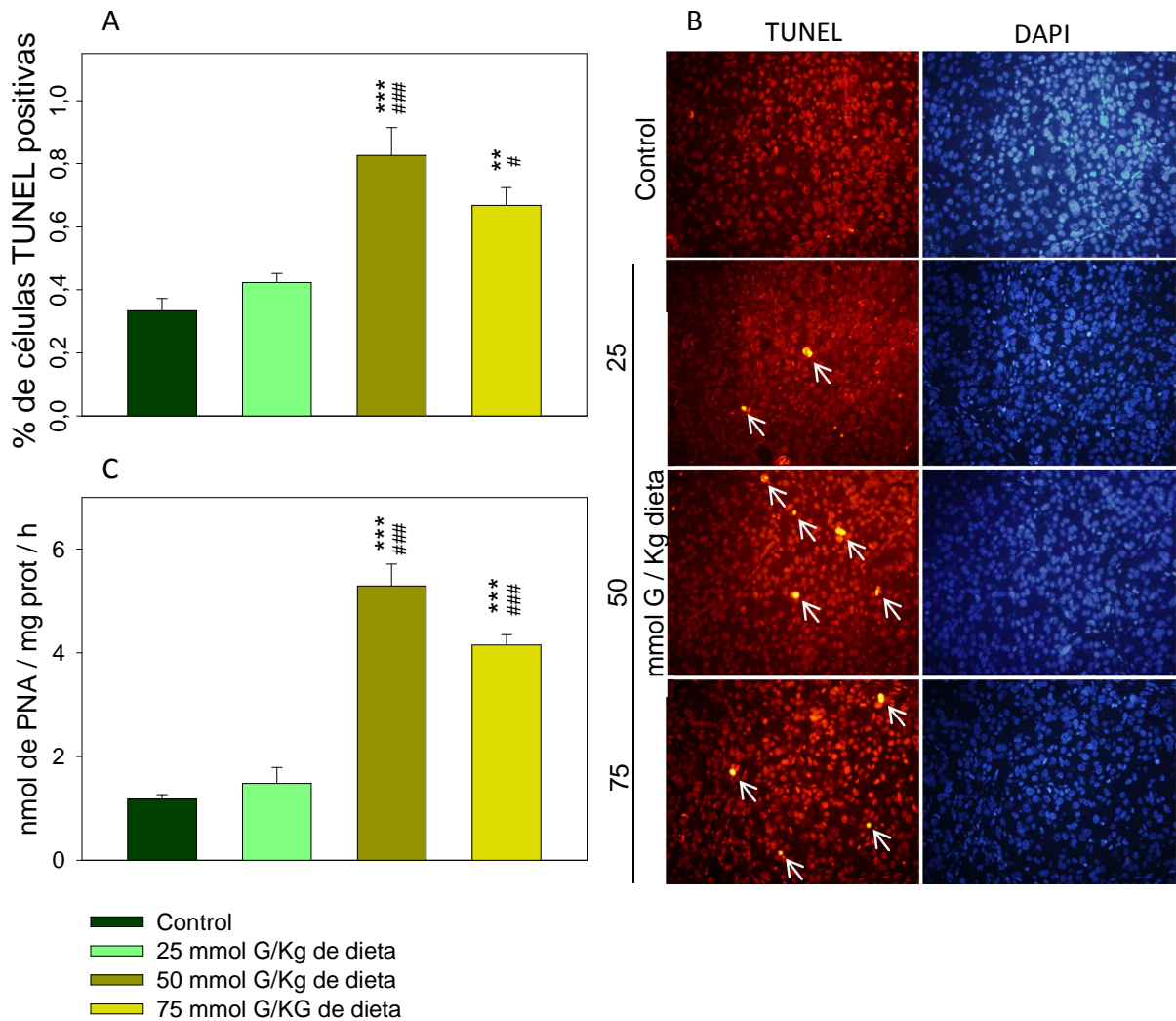


Figura IV.2. Apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas en secciones histológicas del tumor se determinó por el ensayo de TUNEL (A). Micrografías de fluorescencia de las secciones del tumor de los ratones controles y los alimentados con 25, 50, y 75 mmol G / Kg de dieta: las microfotografías del lado izquierdo muestran células TUNEL positivas (células apoptóticas) señaladas mediante flechas y a la derecha se muestran el total de los núcleos teñidos con DAPI (B). La actividad de la caspasa-3 se cuantificó mediante un *kit* comercial tal como se describe en Materiales y Métodos (C) Los valores se expresan como medias \pm SEM, n = 4. (**) p < 0.01; (***) p < 0.001 respecto al control. (#) p < 0.05; (###) p < 0.001 respecto a la dosis 25 mmol G / Kg dieta.

IV.2.4. DETERMINACIÓN DE RAS

Siendo la inhibición en la prenilación de proteínas reguladoras de proliferación celular otro de los posibles mecanismos involucrados en la disminución del crecimiento tumoral (las proteínas una vez preniladas pueden anclarse a la membrana donde son activas), se midieron los niveles de la proteína Ras en membrana y en homogenado de tumor (Figura IV.3).

Se observó que los niveles de esta proteína se redujeron en la membrana de los tumores en los animales tratados con 50 y 75 mmol de G / kg de dieta. Sin embargo, no hubo modificaciones en la cantidad de proteína Ras total medida en el homogenado.

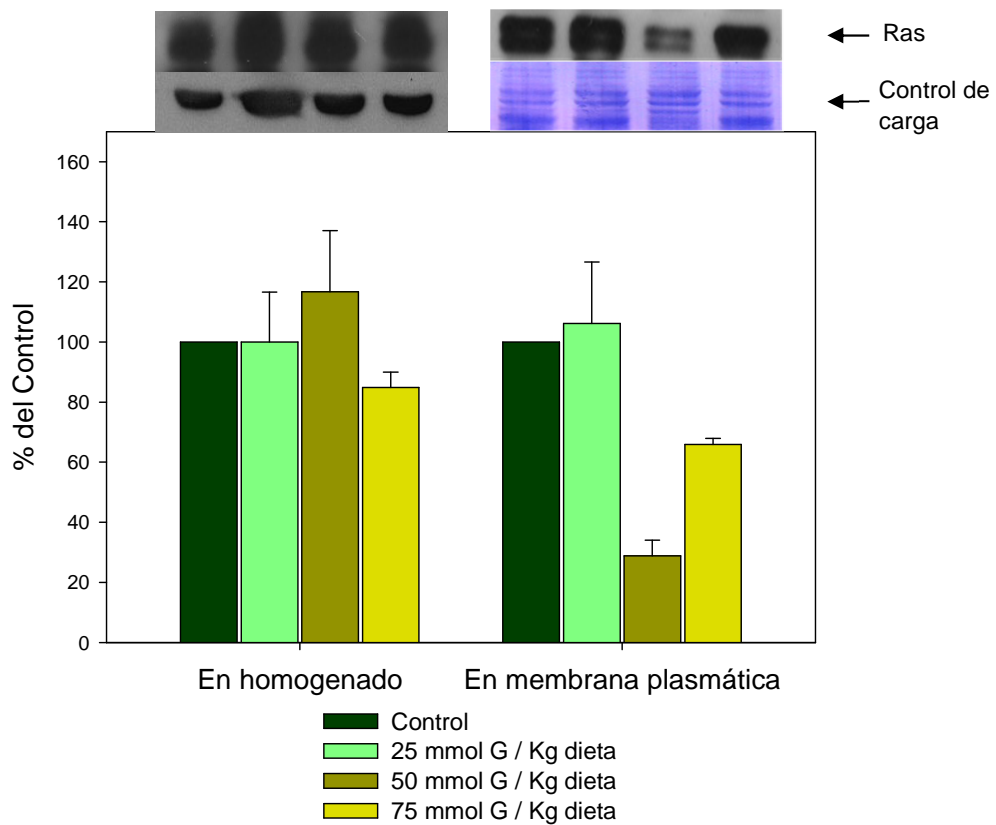


Figura IV.3. Ras. Determinación de Ras en homogenado y en membrana plasmática de los tumores por Western blot. En ambos casos el panel superior muestra las bandas inmunoreactivas de Ras, el panel del medio muestra el control de carga ya sea por inmunoblotting de β -actina (en homogenado) o por tinción de la membrana de PVDF (en membrana plasmática) y el panel inferior muestra las cantidades relativas de Ras expresadas como porcentaje del control. Los resultados expresan como la media \pm SEM, n=3.

IV.2.5 METABOLISMO LIPÍDICO EN ANIMALES CON TUMOR TRATADOS CON GERANIOL

Por otra parte, se analizó el efecto de la portación del tumor sobre el metabolismo lipídico y cómo influye el G a dosis crecientes en animales portadores de tumor.

El colesterol sérico se vio levemente aumentado debido a la presencia del tumor (0.9889 ± 0.0496 g/l en ratones no portadores y 1.0957 ± 0.0752 g/l para animales portadores) y el efecto del G fue similar al que se observó en animales no portadores (ítem III.2.3), donde la colesterolemia disminuyó significativamente en animales tratados a partir de 50 mmol G / Kg de dieta (Figura IV.4). Por otro lado si bien no se obtuvieron diferencias significativas en el contenido, tanto hepático como tumoral, de colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE), con ninguna de las dosis ensayadas, se observa una tendencia a la disminución de CL y CE en hígado y de CL en tumor (Tabla IV.2). Respecto a la incorporación de [14 C]acetato los resultados también se asemejan a los obtenidos en ratones sin tumor (véase ítem III.2.6), ya que en hígado disminuyó significativamente dicha incorporación en lípidos insaponificables (LI) con las tres dosis ensayadas y en ácidos grasos libres (AG) para la dosis mayor, sin embargo la incorporación en lípidos totales (LT) en hígado en esta situación experimental sólo es significativa para la dosis más alta, siendo a partir de 50 mmol / Kg dieta en ratones no portadores tratados con G (Figura IV.5). A su vez, los resultados obtenidos en tumor de animales tratados se corresponden con los de hígado, mostrando una tendencia a disminuir la incorporación de radiactividad en las distintas fracciones lipídicas, siendo significativa sólo en LI de animales tratados con la mayor dosis de G (Figura IV.5).

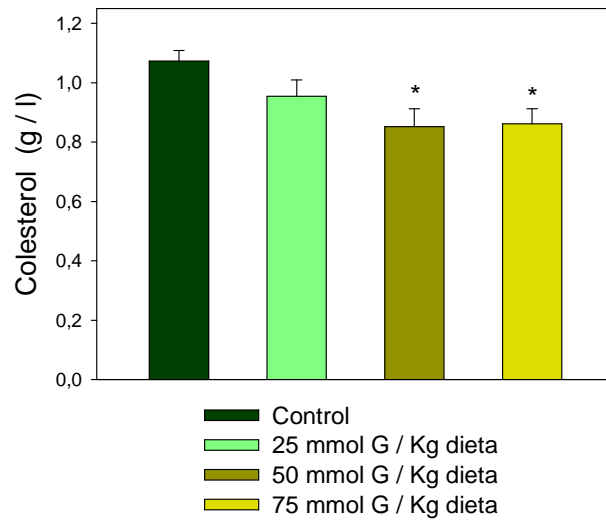


Figura IV.4. Colesterolemia en animales portadores. En suero obtenido al momento del sacrificio de los animales se determinó el contenido de colesterol. Los resultados se expresan como la media \pm SEM con $5 \leq n \leq 20$, (*) $p < 0.05$.

Tabla IV.2. Contenido lipídico hepático y tumoral

	Contenido de Colesterol libre y Esterificado			
	% del Control			
	Hígado		Tumor	
	CL	CE	CL	CE
Control	100 \pm 13.19	100 \pm 11.09	100 \pm 20.91	100 \pm 28.06
25 mmol G / Kg dieta	95.36 \pm 16.17	77.35 \pm 5.39	99.14 \pm 32.09	66.97 \pm 14.85
50 mmol G / Kg dieta	94.39 \pm 19.59	91.70 \pm 3.46	84.33 \pm 24.79	108.01 \pm 30.12
75 mmol G / Kg dieta	66.63 \pm 12.16	87.68 \pm 5.01	77.71 \pm 16.44	101.19 \pm 24.31

Se separaron los lípidos totales extraídos de hígado y tumor por TLC, se reveló la placa por carbonización con $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ y se cuantificaron las bandas correspondientes a colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE). Los resultados se expresan como la media \pm SEM con $n=5$.

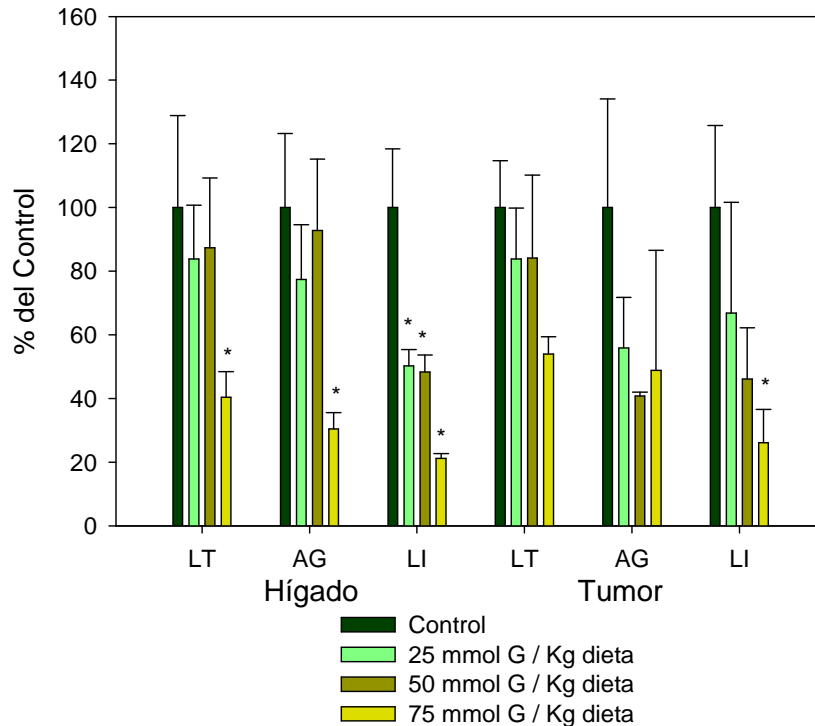


Figura IV.5. Incorporación de acetato. Se inyectó ^{14}C -acetato tres horas previas al sacrificio de los ratones tratados con 0, 25, 50 y 75 mmol de G / Kg dieta y se midió la incorporación de marca radioactiva en LT, AG y LI de hígado y tumor. Los resultados se expresan como la media \pm SEM con $3 \leq n \leq 5$, (*) $p < 0.05$.

IV.2.6. NIVELES DE HMGCR Y SREBP-2

Con el fin de analizar el efecto del G sobre la vía del mevalonato, se cuantificó la enzima limitante de la vía, HMGCR, en citoplasma de hígado y tumor. Los resultados obtenidos evidenciaron una disminución dosis dependiente de la enzima en ambos tejidos (Figura IV.6).

Por último, con el objetivo de cuantificar el factor de transcripción SREBP-2 maduro se analizó por western blot el extracto nuclear obtenido de hígado y tumor de ratones tratados y controles. Las proteínas de la única banda inmunoreactiva obtenida (coincidente además con el peso de SREBP-2 maduro) fueron determinadas por Espectrometría de Masa MALDI-TOF en el "Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI-TOF" (CEQUIBIEM). Este estudio mostró que la proteína presente en la banda no se correspondía con la proteína esperada, por lo que no fue posible obtener resultados de la cantidad de SREBP-2 nuclear.

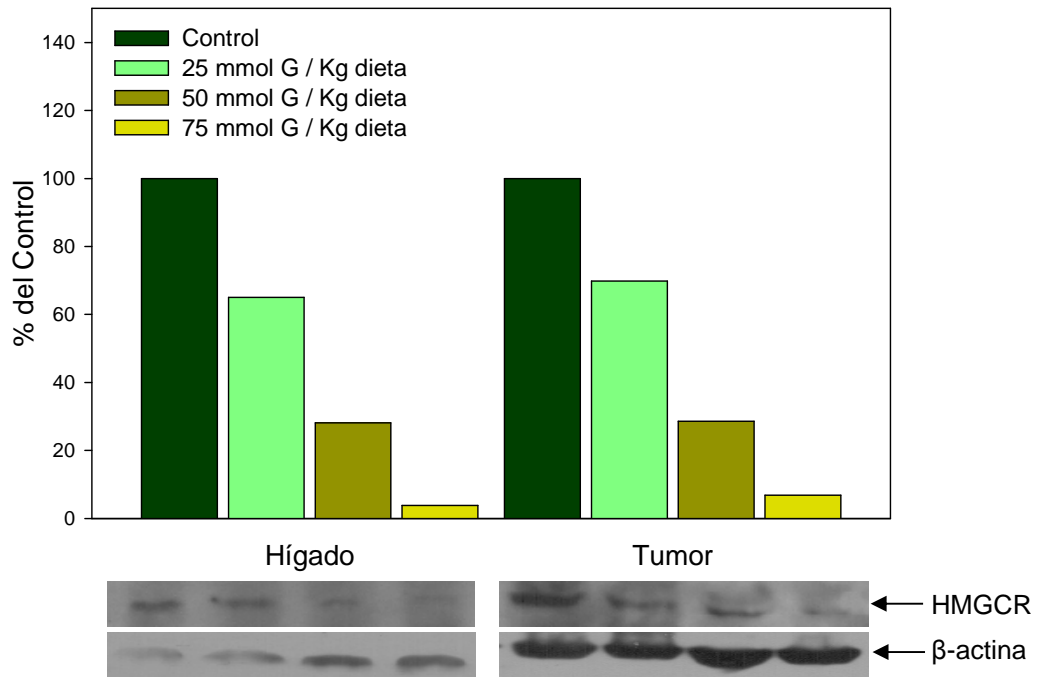


Figura IV.6. Niveles de HMGR. Se cuantificó por westernblot la cantidad proteica de HMGR en la fracción citoplasmática de hígado y tumor de animales tratados con 0, 25, 50 y 75 mmol G / Kg dieta.

IV.3. DISCUSIÓN

El uso de productos naturales como fármacos antineoplásicos es hoy en día un tema de gran interés en la investigación médica humana. Se ha sugerido a los isoprenoides vegetales como supresores del crecimiento de las células cancerosas y del desarrollo del tumor a través de múltiples efectos sobre la vía del mevalonato (Duncan y col. 2004). Los mecanismos moleculares que subyacen a estas acciones, sin embargo, siguen siendo poco conocidos. Estudios recientes demostraron que el G tiene actividad antitumoral significativa en una variedad de sistemas de cultivo de células tumorales de hígado, de colon, de páncreas y cáncer de piel (Carnesecchi y col. 2001; Ong y col. 2006; Stan y col. 2010; Manoharan y col. 2012). Se han reportado también, estudios del G como agente quimiopreventivo atribuible ya sea a su capacidad antioxidante (Chaudhary y col. 2012), como a su capacidad de modular la VM (Ong y col. 2006; Cardozo y col. 2011; Chaudhary y col. 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis muestran que el G no sólo tiene importancia como agente quimiopreventivo, sino también como quimioterapéutico *in vivo*, demostrado por la capacidad del G de disminuir el crecimiento tumoral una vez desarrollado el tumor (figura IV.1).

En cuanto al/los mecanismo/s de acción por el cual este monoterpeno inhibiría el crecimiento tumoral, pudimos observar que hubo un aumento de la apoptosis en células tumorales de los animales tratados con las dosis mayores de G, las cuales causan una disminución en el crecimiento a partir de las dos semanas de tratamiento. Esta inducción apoptótica ha sido reportada, también, en otros trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* (Izumi y col. 1999; Duncan y col. 2004; Ong y col. 2006; Cardozo y col. 2011; Chaudhary y col. 2012). Además, este efecto parece ser más pronunciado en las células malignas que en las células normales (Duncan y col. 2004). En consonancia con esto último, se observó que el G aumentó la cantidad de células apoptóticas en la línea tumoral A549 implantado en ratones (Figura IV.4) sin un aumento en el número de células apoptóticas en el hígado del hospedador

(resultados no mostrados).

Debido a que el crecimiento tumoral estará condicionado tanto por la apoptosis como por la proliferación celular, además de evaluar y demostrar que se induce la muerte celular programada en los tumores de ratones tratados con G, se abordaron estudios bioquímicos de vías metabólicas asociadas con la proliferación celular. Como se describió previamente (ítem I.4), las proteínas de la familia Ras intervienen en distintas cascadas de señalización intracelular que desencadenan procesos de crecimiento y proliferación celular (Vigil y col. 2010). Para ser biológicamente activa, la proteína Ras se une a la membrana plasmática interna en un proceso mediado por grupos prenilo como el farnesil pirofosfato (FPP), donde al intercambiar GDP por GTP gatilla las cascadas de traducción de señales a las que se acopla (Vigil y col. 2010). El FPP se une covalentemente a la proteína Ras (a través de una modificación postraducciona), reacción catalizada por la enzima farnesil-transferasa (Gysin y col. 2011). Ha sido hipotetizado que los isoprenoides podrían afectar a estas modificaciones (Swanson y Hohl 2006), evitando así el funcionamiento óptimo de la proteína Ras. En el presente estudio se demostró que si bien hay una disminución de Ras en membrana, no hay cambios en los niveles totales de la proteína (Figura IV.3), indicando que el G no afectaría la síntesis y/o degradación de la misma y que el déficit en membrana se debería principalmente a una inhibición de prenilación de la proteína. Esto podría deberse a una disminución de la concentración de sustrato, FPP, producto de la modulación de la VM por parte del G (Chaudhary y col. 2012) evidenciado por la disminución de HMGCR en homogenado tanto de hígado como de tumor en animales portadores tratados con G (Figura IV.6). En un informe reciente (Crespo y col. 2013), sin embargo, se sugiere que este efecto no sería el único mecanismo por el que el G inhibe la prenilación de ciertas proteínas. Se ha planteado que el G podría interferir en esta modificación postraducciona por una combinación de eventos incluyendo la limitación de mevalonato y la alteración de la actividad de farnesil-protein-transferasas (Duncan y col. 2004; Mo y Elson 2004).

Deberían realizarse ensayos adicionales para lograr dilucidar el mecanismo de acción del G sobre la prenilación.

Algunos autores correlacionan directamente la inhibición de la prenilación con la inducción apoptótica (Chen y col. 2010), con lo que podríamos suponer que la disminución de la GTPasa, Ras, en membrana es una de las razones que activaría la cascada apoptótica.

Al analizar el efecto de las distintas dosis de G, es notorio que no se observen variaciones significativas entre las dosis mayores (50 y 75 mmol G / Kg de dieta) no sólo en la disminución de crecimiento tumoral (Figura IV.1, Tabla IV.1), sino tampoco en la apoptosis (Figura IV.2) ni en la disminución de Ras en membrana plasmática del tumor (Figura IV.3). Estos resultados sugieren que 50 mmol G / kg de dieta podría ser la dosis que produce la máxima inhibición del crecimiento del tumor, es decir, parecería que el efecto del G a partir de esa dosis se mantiene constante alcanzando una meseta.

La presencia de tumor modifica determinados parámetros lipídicos en el animal huésped (De Antueno y col. 1987). Estudios previos realizados en el laboratorio mostraron que el implante tumoral de células A549 en ratones nude produce alteraciones en el metabolismo lipídico de los animales, induciendo una hipercolesterolemia, modificando el contenido hepático de colesterol y su síntesis en hígado, riñón, corazón y pulmón (Bellini 2003). Los resultados actuales corroboran la tendencia del tumor a aumentar la colesterolemia. Los efectos de las distintas dosis de G son consistentes con los observados en ratones nude no portadores (capítulo III), ya que conforme aumenta la dosis de G disminuye la síntesis de colesterol en hígado (evidenciada por la disminución de la incorporación de [¹⁴C]acetato en lípidos insaponificables) y sus niveles en sangre, y aunque tampoco se aprecian variaciones significativas en el contenido hepático de colesterol tanto libre como esterificado (tabla IV.2), existe una tendencia a disminuir conforme aumenta la dosis de G. Esta tendencia podría deberse a las alteraciones en el metabolismo lipídico

ocasionadas por el implante tumoral per se, ya que es un tejido de replicación muy activa y consecuentemente demandante de metabolitos. En lo correspondiente al tumor de los animales tratados con G, los parámetros lipídicos tienen un comportamiento similar a lo observado en el hígado, mostrando una tendencia a disminuir la incorporación de [¹⁴C]acetato en LT, AG y LI, siendo significativa sólo en LI y para la mayor dosis de G (Figura IV.5).

Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que el G inhibe la síntesis de lípidos insaponificables tanto en las células tumorales como en las células del hígado (no tumorales) (Figura IV.5), y si bien no ha sido factible cuantificar cada uno de los componentes de dicha fracción, numerosos estudios *in vitro* en nuestro laboratorio han demostrado que es el colesterol el principal lípido insaponificable cuya biosíntesis se inhibe por G (Polo y de Bravo 2006; Polo y col. 2011; Crespo y col. 2013). Además, las dosis más altas de G disminuyeron significativamente la concentración de colesterol en suero en los ratones tratados (Figura IV.4). Estos resultados sugieren un incremento de la captación del colesterol exógeno, vía LDLR, por parte de las células hepáticas, efecto consistente con los resultados mostrados en el capítulo III que indicaban un incremento en la expresión del ARNm de dicho receptor en hígado de ratón debido al tratamiento con G.

Por otra parte, también debe tenerse en cuenta que varios lípidos celulares (además de los derivados de la vía del mevalonato) están cumpliendo un papel importante en el crecimiento y la división celular.

Se encontró que el G inhibe la biosíntesis de ácidos grasos, en el hígado del ratón y existe una tendencia a disminuir dicha síntesis en las células tumorales implantadas. Estudios en cultivo, además, mostraron que el G inhibe la biosíntesis de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina) en células HepG2 (Crespo y col. 2013). Estos resultados demuestran que el G limita claramente la disponibilidad de lípidos que son esenciales para el crecimiento y la proliferación celular produciendo una disminución del desarrollo debido a un bloqueo del crecimiento celular y a una inducción de la

apoptosis.

La supervivencia, la muerte y el ciclo celular de las células tumorales son mecanismos que se encuentran interconectados (Maddika y col. 2011). Recientemente hemos publicado que G inhibe la progresión del ciclo celular (con una detención que ocurre en la interfase G0/G1) en células derivadas de un hepatoblastoma humano (Crespo y col. 2013). Por ello, se propone que los mecanismos por los que el G podría ejercer actividad antitumoral contra las células A549 implican asociaciones entre las siguientes acciones: la supresión de la síntesis de lípidos esenciales para el crecimiento celular, tales como ácidos grasos, colesterol y grupos prenilo, y la inhibición de las enzimas preniltransferasas pertinentes. Estos efectos, a su vez, inducen una detención en la progresión del ciclo celular, junto con una estimulación concomitante de la apoptosis. Por otra parte, todos los efectos antitumorales observados en nuestros experimentos se produjeron a dosis dietéticas que no causan toxicidad en los animales (Tabla IV.1). En consecuencia estos resultados apuntan a la posibilidad de que el G puede ser un candidato prometedor para su uso en la prevención y la terapia humana de cáncer de pulmón con el beneficio añadido de su baja toxicidad.

V

Efecto de la simvastatina sobre el
metabolismo del colesterol y el
crecimiento tumoral

V.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS

Se implantaron 10^7 células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) en ratones NIH nu/nu de aproximadamente dos meses de edad, luego del desarrollo los tumores se mantuvieron los carcinomas por repiques sucesivos como se describe en Materiales y Métodos (ítem II.2.2).

Una vez desarrollado en los animales un tumor de tamaño medible (300mm^3 aproximadamente), los animales se dividieron en dos lotes: un grupo control y un grupo tratado con simvastatina (S). Estudios previos realizados en el laboratorio mostraron que 50 mg / Kg peso / día de S ocasionan un incremento en la cantidad de HMGCR hepática en estos animales, sin ocasionar efectos adversos aparentes (Polo y Bravo 2001). Se suplementó el agua de bebida de los animales tratados con la dosis previamente mencionada y se calculó la dosis real midiendo la cantidad de agua ingerida. El tratamiento se prolongó por tres semanas. Tres horas previas al sacrificio se les inyectaron (vía intraperitoneal) 25 μCi de [^{14}C]acetato. Durante las semanas de tratamientos se realizaron periódicamente las mediciones del volumen tumoral (II.2.3). Se midió el grado de apoptosis en los tumores obtenidos en la necropsia (II.8). Se cuantificaron los niveles de la proteína Ras en membrana y en homogenado de células tumorales (II.5.5).

Se determinó colesterol sérico (II.3.6); en hígado y en tumor se midió contenido de colesterol (libre y esterificado) (II.3.1), incorporación de [^{14}C]acetato en colesterol y precursores (lípidos insaponificables), en ácidos grasos y en lípidos totales (II.3.4).

V.2. RESULTADOS

V.2.1. DOSIS Y TOXICIDAD

Se calculó la dosis de S incorporada según la cantidad de agua ingerida por los animales. A su vez, se corroboró que dicha dosis no presentó efectos adversos determinando el peso corporal y hepático de los animales (tabla V.1).

Tabla V.1. Dosis de S y su efecto sobre el peso corporal y hepático

	Dosis mg/Kg peso/día	PC inicial (g)	PC final (g)	PH (g)
Control	----	25.2 ± 0.8	28.0 ± 1.2	1.71 ± 0.24
Simvastatina	45.5 ± 2.61	23.6 ± 0.6	25.4 ± 1.0	1.33 ± 0.31

Durante las tres semanas de tratamiento se midió la dosis de S ingerida por cada animal; se determinó el peso corporal (PC) y el peso del hígado (PH) en los animales. Los valores son media ± SEM, n = 5. Los valores de cada columna no difieren significativamente ($p > 0,05$).

V.2.2. CRECIMIENTO TUMORAL

Se evaluó el efecto de S sobre el crecimiento tumoral (Figura V.1.). Se observa una disminución del volumen tumoral en animales tratados respecto a los controles a lo largo del tratamiento que se demuestra estadísticamente significativa al analizar los volúmenes relativos (V_r) del tumor, es decir, expresando los resultados como V_i / V_0 , donde V_i es el volumen tumoral medido en el tiempo i y V_0 es el volumen tumoral medido al inicio de cada experimento.

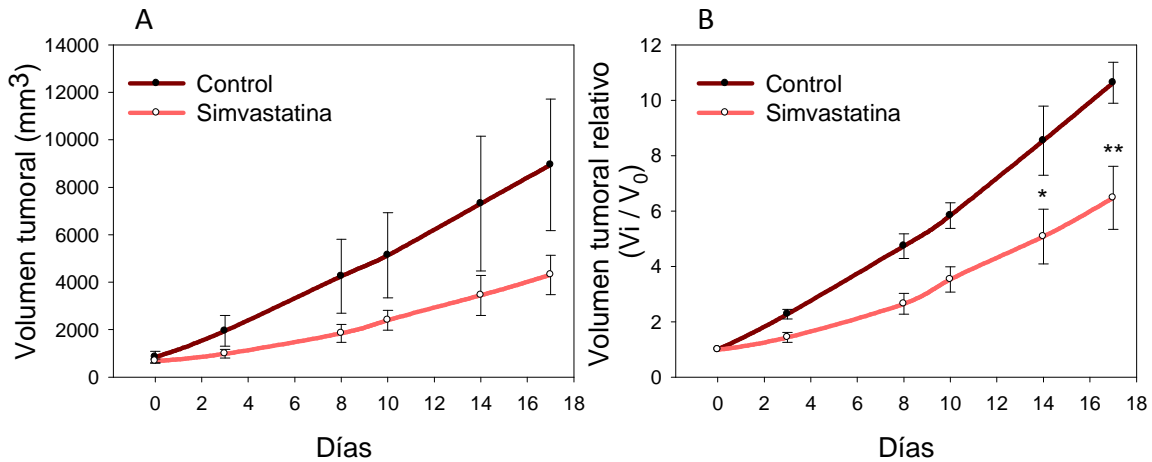


Figura V.1. Crecimiento tumoral. Ratones portadores de tumor, de 300 mm^3 aproximadamente, fueron separados en dos lotes: control y tratados con S (50 mg / Kg peso / día) durante tres semanas y periódicamente se midió el tamaño tumoral. Los gráficos representan el volumen tumoral total (A) y el volumen tumoral relativo (B) en el curso del tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n=5$. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ vs control.

V.2.3. APOPTOSIS TUMORAL

Con el objetivo de conocer los posibles mecanismos responsables de la disminución de crecimiento tumoral, se cuantificó la apoptosis en tumores de los ratones del grupo control y los tratados con S mediante el análisis de los mismos parámetros utilizados para evaluar apoptosis en animales tratados con G (Capítulo IV) midiendo actividad de Casapasa-3, enzima común a vías tanto intrínseca como extrínseca de la cascada apoptótica, y cuantificando el porcentaje de células apoptóticas por el método de TUNEL (Figura V.2). Se observó que existe un aumento estadísticamente significativo en la apoptosis tumoral en animales tratados con S, evidenciado por ambas metodologías. Esto indicaría que esta droga, a las dosis ensayadas, posee un efecto proapoptótico.

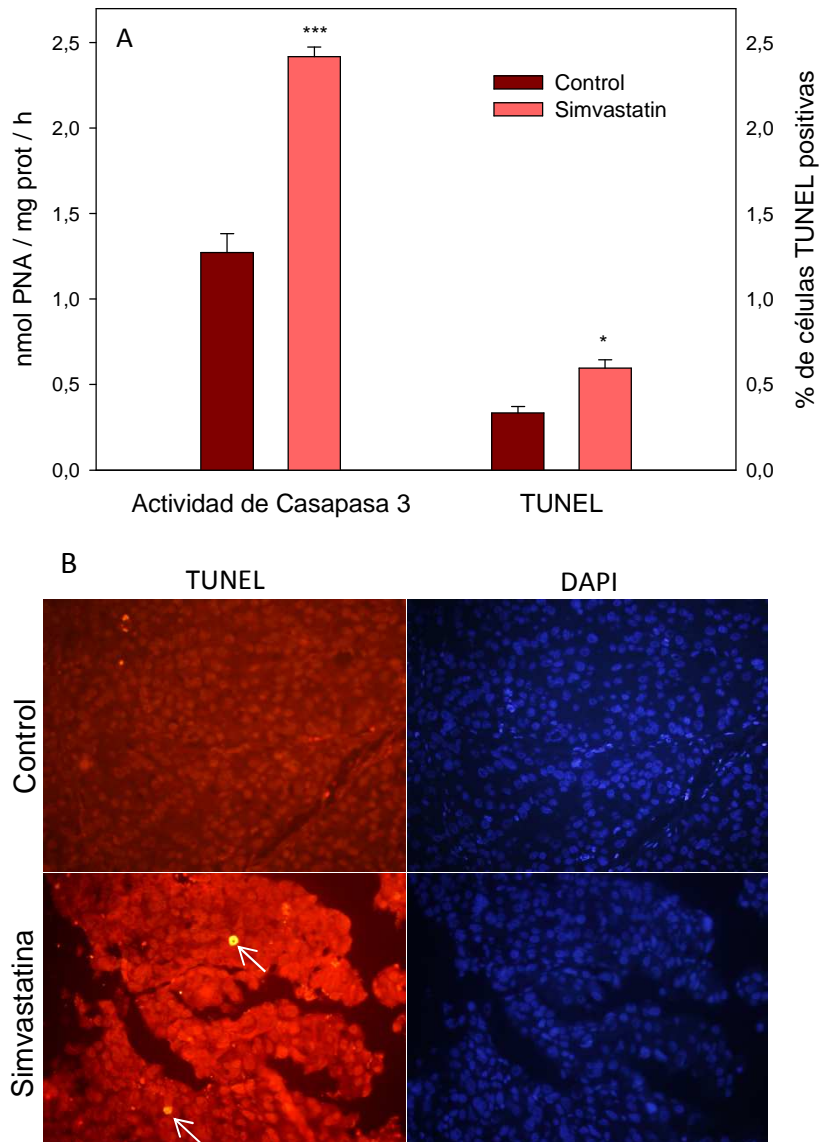


Figura 2. Apoptosis. En homogenados de células tumorales de ratones controles y tratados con S (50 mg / Kg peso / día) se cuantificó la actividad de caspasa-3 y en los cortes histológicos de los tumores se determinó el porcentaje de células apoptóticas por el método de TUNEL. Los valores se expresan como la media \pm SEM, $3 \leq n \leq 8$. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$ (A). Micrografías de fluorescencia de las secciones del tumor de los ratones controles y los tratados con S: los núcleos de las células apoptóticas (TUNEL-positivas) señalados con flechas se muestran en los cortes teñidos con rodamina (imágenes de la izquierda) y la totalidad de los núcleos se evidencian con tinción con DAPI (imágenes de la derecha) (B).

V.2.4. DETERMINACIÓN DE RAS

Se determinaron los niveles de Ras en homogenado (Ras total) y Ras en membrana plasmática aislada (II.5.5) con el objetivo de relacionar la prenilación de dicha proteína con el efecto antiproliferativo de la droga.

Se observó que no se modificaron los niveles totales de la proteína en el homogenado del tumor como consecuencia del tratamiento con S. Sin embargo, hubo una disminución de la proteína anclada a membrana en los animales tratados con S con respecto a los controles (Figura V.3).

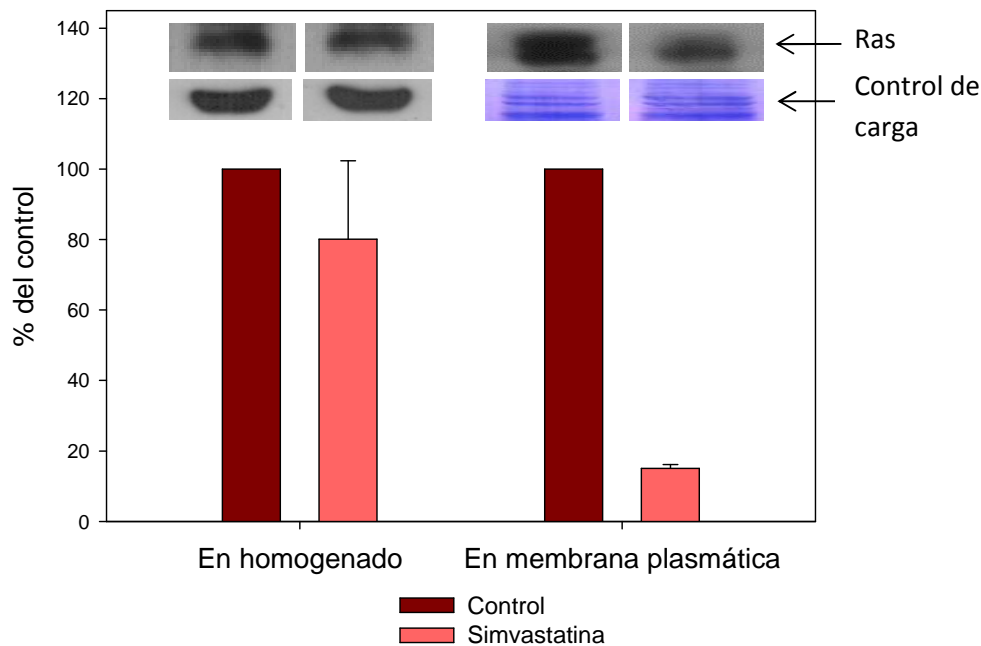


Figura V.3. Ras. Determinación de Ras en homogenado y en membrana plasmática de los tumores por Western blot. En ambos casos el panel superior muestra las bandas inmunoreactivas de Ras, el panel del medio muestra el control de carga ya sea por inmunoblotting de β -actina (en homogenado) o por tinción de la membrana de PVDF (en membrana plasmática) y el panel inferior muestra las cantidades relativas de Ras expresadas como porcentaje del control. Los resultados expresan como la media \pm SEM, n=3.

V.2.5. METABOLISMO LIPÍDICO EN ANIMALES CON TUMOR TRATADOS CON SIMVASTATINA

Con el propósito de conocer el efecto de la S sobre el metabolismo lipídico en animales portadores de tumor, se evaluó el colesterol plasmático, el contenido de colesterol libre (CL) y esterificado (CE) en hígado y en tumor, y la incorporación de [¹⁴C]acetato en lípidos totales (LT), ácidos grasos (AG) y lípidos insaponificables (LI) tanto en hígado como en tumor. Se observó que si bien existe una tendencia a disminuir la colesterolemia en los animales tratados con S, esta disminución no es estadísticamente significativa. Tampoco se evidenciaron cambios en el contenido de colesterol y éster de colesterol hepático y tumoral (tabla V.2). Por último, los resultados correspondientes al efecto de la S sobre la síntesis lipídica en hígado de ratones portadores y en tumor, evaluada mediante la incorporación de [¹⁴C]acetato, mostraron que existe una clara tendencia a disminuir la síntesis de LI, tanto en hígado como en tumor, pero no se apreciaron cambios en la incorporación de radiactividad en AG y en LT (tabla V.3).

Tabla V.2. Colesterolemia y contenido de colesterol libre y esterificado

	Colesterolemia (g /l)	Contenido de colesterol libre y esterificado % del Control			
		Hígado		Tumor	
		CL	CE	CL	CE
Control	1.12 ± 0.05	100 ± 11.49	100 ± 7.55	100 ± 8.37	100 ± 34.0
Simvastatina	1.08 ± 0.06	115 ± 27.06	142 ± 34.61	109 ± 9.53	122.8 ± 25.7

Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca de animales portadores de tumor controles y tratados con S (50 mg / Kg peso / día) y se determinó el colesterol sérico enzimáticamente como se describe en Materiales y Métodos. Del tejido hepático y tumoral se extrajeron los lípidos totales y se separaron por TLC, se reveló la placa por carbonización con FeCl₃.H₂SO₄ y se cuantificaron las bandas correspondientes a colesterol libre (CL) y colesterol esterificado (CE). Los resultados se expresan como la media ± SEM n=5.

Tabla V.3. Incorporación de ^{14}C -acetato

	Hígado			Tumor		
	LT	AG	LI	LT	AG	LI
Control	100±18.52	100±20.6	100±30.3	100±11.6	100±9.2	100±13.1
Simvastatina	117.5±24.8	106.8±27.8	86.4±7.0	135.7±42.2	135.4±47.7	78.0±23.7

A ratones portadores de tumor (controles y tratados con 50 mg S/ Kg peso / día) se les inyectó [^{14}C]acetato tres horas previas al sacrificio y se midió la incorporación de marca radioactiva en lípidos totales (LT), ácidos grasos (AG) y lípidos insaponificables (LI). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, n=5.

V.3. DISCUSIÓN

Las estatinas se han convertido en una de las drogas más prescritas en el mundo para el tratamiento de dislipemias y en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Stancu y Anca 2001; Taylor y col. 2013). Independientemente de los efectos producidos en el perfil lipídico, las estatinas ofrecen beneficios cardiovasculares adicionales gracias a que poseen efectos celulares conocidos como pleiotrópicos, los cuales impactan en la homeostasis de la pared arterial (Mennickent y col. 2008). Dichos efectos se deben a que las estatinas son capaces de interferir en la síntesis de isoprenoides derivando en una disminución en la prenilación de ciertas proteínas, involucradas en mecanismos de regulación de proliferación, apoptosis y función endotelial de las células del músculo liso vascular, afectando su anclaje a la membrana plasmática y consecuentemente interfiriendo en la funcionalidad del receptor al que se acoplan cuando están preniladas, inhibiendo así la cascada de traducción de señales que habitualmente gatillan (Mennickent y col. 2008). Esta inhibición de prenilación ha sido blanco de muchos estudios donde se sugiere su uso en diferentes enfermedades que contemplan no sólo la dislipemia, sino también la inflamación, desórdenes en la inmunidad y en la proliferación celular (Bonovas y col. 2005; Paraskevas 2008; Ramos-Esquivel y León-Céspedes 2007; Maneechotesuwan 2010). En el presente estudio se evaluó a la simvastatina (una de las estatinas más utilizadas en los tratamientos hipocolesterolemiantes), como agente antitumoral, mostrando una inhibición significativa de proliferación de células A549 implantadas en ratones nude (Figura V.1). Sin embargo el efecto sobre el crecimiento tumoral parece ser menos importante que el obtenido con G, donde el crecimiento se reduce significativamente para las tres dosis (25, 50 y 75 mmol G / Kg dieta) al final del tratamiento entre un 52% y un 83% (Figura IV.1) siendo la inhibición para las estatinas de un 50% y no significativo al expresar los resultados como volumen tumoral, volviéndose significativo al referir los volúmenes tumorales

al tamaño inicial (volumen relativo) (Figura V.1). Al igual que para los tratamientos con G los resultados obtenidos para S mostraron una disminución de la cantidad de Ras anclada a membrana en las células tumorales de los animales tratados respecto a los controles, sin cambios en los niveles totales de la proteína lo que indicaría una disminución en la prenilación de la proteína. Sin embargo, está descrito en la bibliografía que a concentraciones terapéuticas hipocolesterolemiantes las estatinas no sólo no disminuyen la prenilación de Ras, sino que activan la cascada de transducción de señales de la GTPasa (Cho y col. 2011), lo que podría explicar el efecto dual observado en estatinas donde a concentraciones bajas (terapéuticas) hay un aumento en la tasa de crecimiento tumoral, mientras que se observa una inhibición de crecimiento a concentraciones 10 veces mayores (Wang y col. 2010). Por lo cual, la utilización de las estatinas como drogas antitumorales es muy discutida.

Se observó en estudios *in vitro* que la proliferación celular inhibida por estatinas se revierte por el agregado de FPP, GGPP y mevalonato pero no por escualeno, intermediario río debajo del FPP y GGPP en la vía de síntesis de colesterol (Cafforio y col. 2005), por lo que se podría especular que la inhibición de la prenilación de pequeñas GTPasas se debe fundamentalmente a una disminución de sustrato FPP disponible y no a una inhibición de la prenil proteín transferasa como se plantea para G. A su vez, el hecho de que la recuperación de la proliferación sea total (Cafforio y col. 2005) nos hace pensar en que esta inhibición de prenilación es esencial en la regulación tanto de la proliferación celular como de la apoptosis.

Al igual que con G, también se evidenció un aumento de la apoptosis en células tumorales de los animales tratados con S. Esto último, podría deberse a la activación de la cascada apoptótica intrínseca, vía liberación de citocromo c por parte de la mitocondria, como se reportó para células en cultivo (Zhong y col. 2003; Cafforio y col. 2005).

Si bien con las dosis utilizadas en el presente trabajo (50 mg S / Kg peso / día) se demostró una disminución del crecimiento tumoral, la cantidad de S administrada por kg de peso fue superior a la dosis máxima recomendada en terapias hipocolesterolemiantes en humanos (1mg / Kg / día). Sin embargo, ensayos clínicos de fase 1 donde se evalúan los efectos de las estatinas en el tratamiento del cáncer mostraron que dosis de 17 mg / Kg / día fueron bien toleradas por los pacientes (Thibault y col. 1996).

Como ya se mencionó, es bien conocido que las estatinas ejercen un efecto hipocolesterolemiantes en humanos por inhibir competitivamente HMGCR, con lo cual al disminuir la síntesis de colesterol, disminuye el colesterol tisular, aumenta la expresión de LDLR y la consecuente captación de colesterol plasmático por los tejidos (Stancu y Anca 2001). Sin embargo, en los ensayos realizados en este trabajo no se observa una disminución significativa de la colesterolemia en los animales tratados con S, lo que concuerda con estudios previos que han demostrado efectos similares no sólo en ratones sino también en ratas (Akira y col. 1979; Polo y Bravo 2001). Se reportó además que roedores tratados con la estatina compactina mostraron una disminución de los ácidos biliares excretados con las heces, con un concomitante déficit de 7 α -hidroxilasa, enzima limitante en la vía de síntesis de los ácidos biliares (Akira y col. 1979). Estos resultados sugerirían que en estas especies, las estatinas si bien inhiben HMGCR, no producen un efecto hipocolesterolemiantes posiblemente debido a un efecto compensatorio producido por la disminución en la excreción de colesterol. Además, debe tenerse en cuenta que durante el tratamiento realizado a los ratones en el presente trabajo, no se restringió el colesterol dietario (1.43 \pm 0.5 mg colesterol / gr de alimento) mientras que el efecto hipocolesterolemiantes en humanos puede requerir un tratamiento farmacológico acompañado de una dieta baja en colesterol (Cuello y col. 2013). Sin embargo, si bien el efecto hipolipemiantes de S en ratones nude demostró ser escaso, hay una

tendencia a disminuir la síntesis de colesterol, observada por la disminución en la incorporación de lípidos insaponificables; (tabla V.2). La falta de evidencia del efecto hipocolesterogénico puede deberse a que las estatinas son menos efectivas en ratones portadores que en no portadores, como fue descrito previamente en nuestro laboratorio (Polo y Bravo 2001).

Concluimos entonces, que dosis de 50 mg / Kg peso / día de la estatina simvastatina ejercen una inhibición en el crecimiento tumoral en ratones atímicos se debería fundamentalmente a la inhibición de la enzima limitante de la vía del mevalonato HMGCR (efecto ampliamente reportado en la bibliografía), disminuyendo el pool celular de mevalonato y limitando consecuentemente la cantidad de isoprenoides necesarios para la prenilación de proteínas Ras, afectando su anclaje a membrana y por lo tanto su funcionalidad. Estas proteínas Ras no funcionales inhibirían la proliferación celular y se activaría la apoptosis como consecuencia de su rol regulador en dichos procesos metabólicos.

VI

Efecto de la combinación de
simvastatina y geraniol sobre el
metabolismo lipídico y el crecimiento
tumoral

VI.1. DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO REALIZADO

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (capítulos IV y V) y en ensayos previos realizados en el laboratorio (Polo y Bravo 2001), animales portadores de tumor subcutáneo de células A549, mantenidos como se detalla en Materiales y Métodos (incisos II.2.1 y II.2.2), se separaron en cuatro grupos: un grupo control y tres grupos experimentales; un grupo tratado con G (50 mmol / Kg de dieta) adicionado al alimento, otro con S (50 mg / Kg peso / día) suministrada en el agua de bebida y un grupo con la combinación de ambos compuestos a las concentraciones previamente mencionadas (G + S). El tratamiento se realizó durante tres semanas, en las cuales se monitoreó el crecimiento de los tumores y se controló asimismo el peso, el consumo de alimento y de agua de los animales.

A las 3 semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de suero, hígado y tumor. Se midió apoptosis tumoral (Sección II.8) y los niveles de Ras total y Ras anclada a membrana plasmática de las células tumorales (II.5.5). Se determinó colesterol plasmático, hepático y tumoral (II.3.6; II.3.1), incorporación en hígado y en tumor de [¹⁴C]acetato en lípidos totales (LT), lípidos insaponificables (LI) y ácidos grasos (AG) (II.3.4).

VI.2. RESULTADOS

VI.2.1. TOXICIDAD

Durante el tratamiento se llevó a cabo el seguimiento de los animales sin observarse cambios en su comportamiento. A su vez se determinó el peso corporal y hepático corroborándose que el tratamiento administrado a cada grupo no le generó ningún perjuicio apreciable a los ratones, ya que los parámetros evaluados no difirieron en los lotes tratados, ya sea con S, G o ambos respecto a los controles (tabla VI.1).

Tabla VI.1. Efecto del geraniol (G), la simvastatina (S) y su combinación (G + S) sobre el peso corporal y hepático

	PC inicial	PC final	PH
	g	g	g
Control	23.7 ± 0.7	28.0 ± 0.8	1.81 ± 0.06
G	23.4 ± 1.2	27.0 ± 1.3	1.85 ± 0.10
S	23.7 ± 0.7	26.6 ± 0.7	1.78 ± 0.04
S + G	23.8 ± 1.0	27.0 ± 1.3	1.80 ± 0.09

Se determinó peso corporal (PC) al inicio y al final del tratamiento y el peso del hígado (PH) en los animales tratados con G y/o S en los animales controles. Los valores representan la media ± SEM (n=5). Los valores no difieren significativamente ($p > 0,05$).

VI.2.2. CRECIMIENTO TUMORAL

Como se mencionó en capítulos anteriores (incisos IV.2.1 y V.2.2) se midió periódicamente el volumen tumoral de los animales durante las tres semanas de tratamiento, mostrando una inhibición de crecimiento tumoral a partir del día 14 de tratamiento tanto para S como para G a las concentraciones ensayadas (Figura VI.1). La inhibición de crecimiento con la combinación de ambos compuestos es mayor

Efecto de la combinación de simvastatina y geraniol sobre el metabolismo lipídico y el crecimiento tumoral

que el observado para cada uno de los tratamientos individuales. Asimismo, la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con G + S tiene una mayor significancia estadística respecto a los controles ($p < 0,001$) que los tratamientos individuales ($p < 0,05$ o $p < 0,01$). Sin embargo, para las dosis utilizadas, a lo largo de todo el tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los tres lotes tratados (Figura VI.1).

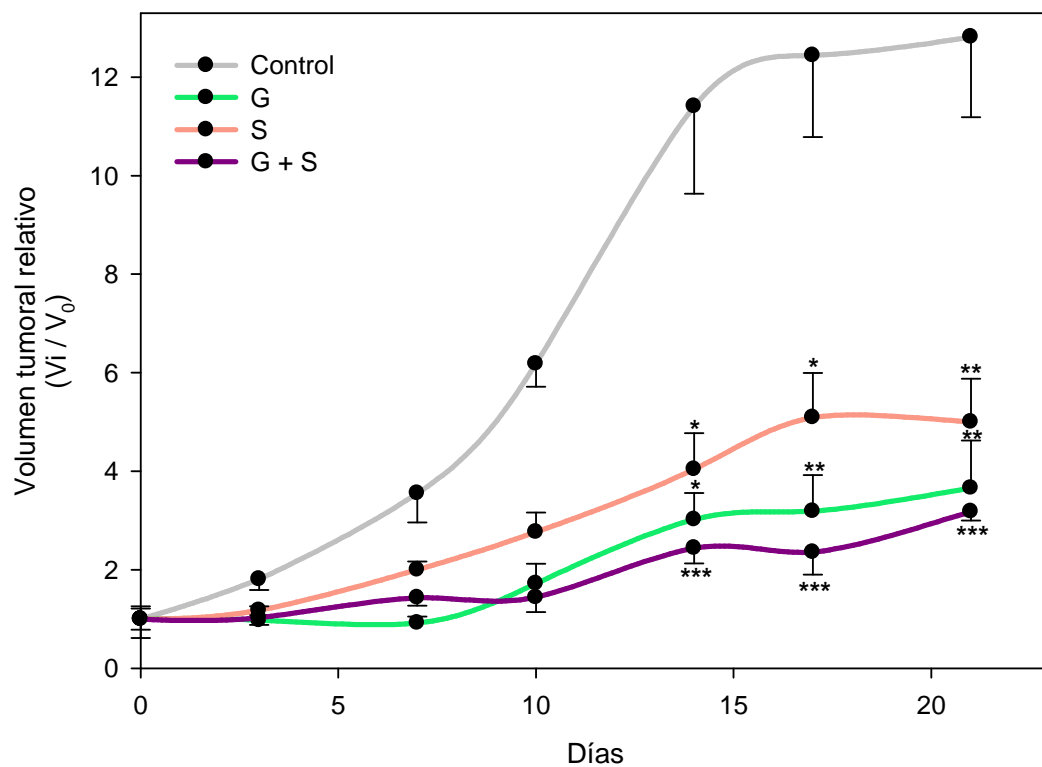


Figura VI.1. Crecimiento Tumoral. Ratones portadores de tumor, de 300 mm^3 aproximadamente, se dividieron en cuatro lotes, un grupo control y tres experimentales, los cuales fueron tratados con S (50 mg/Kg peso/día), G (50 mmol / Kg de dieta) y la combinación de ambos (G + S) a las dosis mencionadas durante tres semanas. Periódicamente se midió el tamaño tumoral. El gráfico representa el volumen tumoral relativo (V_r) a lo largo del tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm SEM, $n=5$. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

VI.2.3. APOPTOSIS TUMORAL

Se determinó apoptosis en el tumor de los animales midiendo la actividad de Caspasa-3. Se corroboró lo expuesto anteriormente (Capítulos IV y V) observándose que tanto G como S tienen una fuerte inducción de la apoptosis, siendo la actividad de Caspasa-3 significativamente mayor en los animales tratados con dichos compuestos que en los controles. Si bien se observó un incremento significativo de la actividad de esta proteasa en los tumores de los animales tratados con G + S respecto a los controles y fue mayor que en los tratamientos con S o G, no fue un aumento estadísticamente diferente a los obtenidos en los tratamientos individuales (figura VI.2).

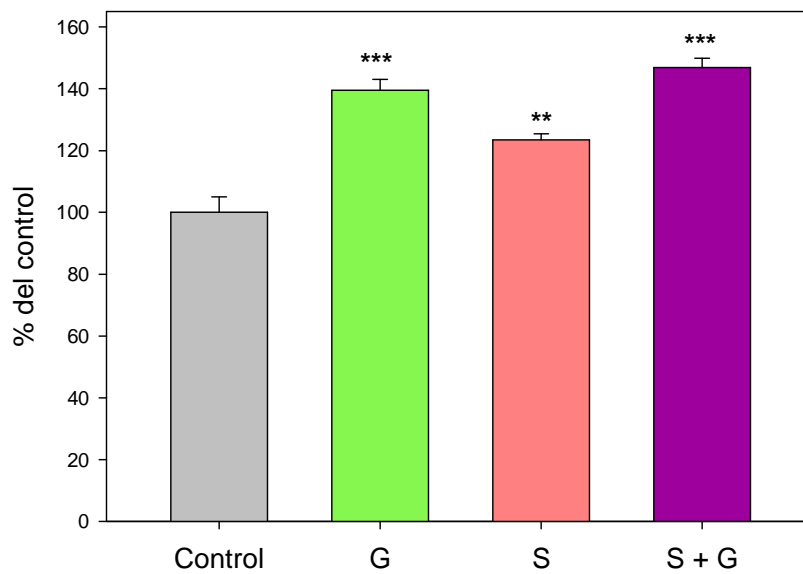


Figura VI.2. Actividad de Caspasa-3. En homogenados de tumor se determinó la apoptosis cuantificando la actividad de caspasa-3. Los valores se expresan como la media \pm SEM, con un n = 5. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0.001$.

VI.2.4. DETERMINACIÓN DE RAS

Se evaluaron los niveles de Ras en membrana y Ras en homogenado en los cuatro lotes de animales y se demostró una disminución mayor al 60% de la proteína anclada a membrana para los animales de los tres lotes tratados con respecto a los controles. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles totales de la misma cuando se trataron los animales con G y/o S; la combinación de los componentes no mostró una inhibición mayor que los tratamientos individuales (Figura VI.3).

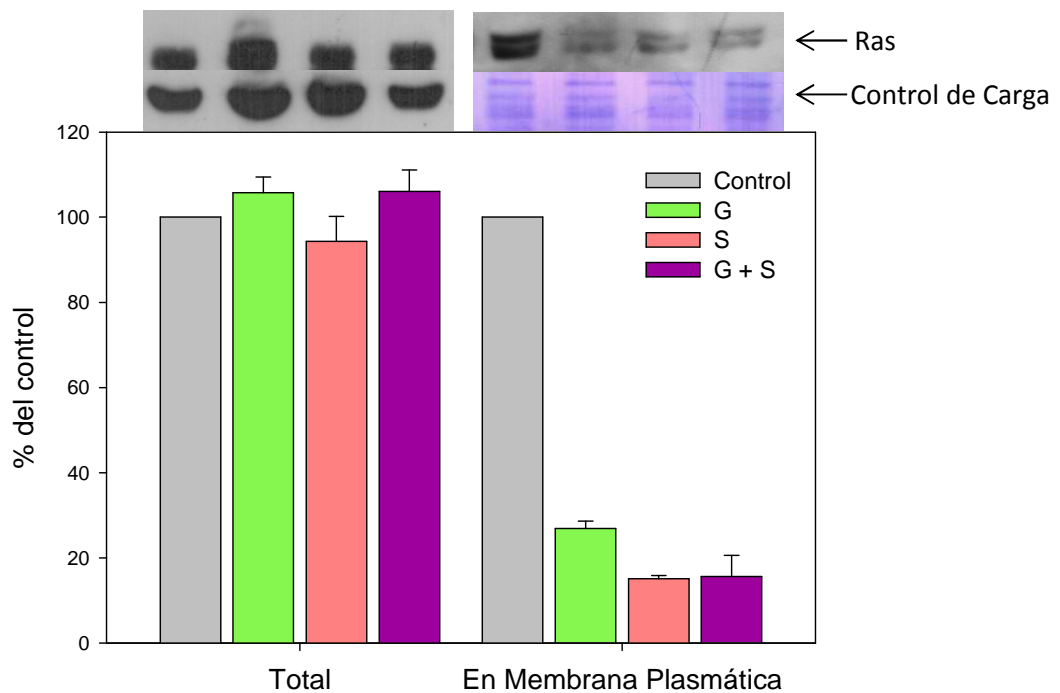


Figura IV.3. Ras. Determinación de Ras en homogenado y en membrana plasmática de los tumores por Western blot. En ambos casos el panel superior muestra las bandas inmunoreactivas de Ras, el panel del medio muestra el control de carga ya sea por inmunoblotting de β -actina (en homogenado) o por tinción de la membrana de PVDF (en membrana plasmática) y el panel inferior muestra las cantidades relativas de Ras expresadas como porcentaje del control. Los resultados expresan como la media \pm SEM, n=3.

VI.2.5 METABOLISMO LIPÍDICO EN ANIMALES CON TUMOR TRATADOS CON SIMVATATINA Y/O GERANIOL

Como se describió en los capítulos IV y V, tanto el tratamiento con G, como con S no modifican el contenido lipídico hepático y tumoral de los animales. Al evaluar el efecto combinado de S y G tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto a los ratones control (resultados no mostrados). Sin embargo, si bien a las dosis ensayadas de S y G no disminuyen significativamente la síntesis de LT y AG ni en hígado ni en tumor y la disminución de la incorporación de [¹⁴C]acetato en LI sólo fue estadísticamente significativa en hígados de animales tratados con G, la administración de S y G en conjunto logran reducir significativamente estos valores (incorporación de radioactividad en LT, LI y AG) en ambos tejidos (Tabla VI.2). Se calculó si la combinación de los componentes fue sinérgica calculando el parámetro R según Kern y col. (1988).

$R = (S_{exp}) / (S_{obs})$ donde:

- S_{exp} = valor de recuperación de radioactividad esperado: es el producto del porcentaje de recuperación observado después del tratamiento con S y el porcentaje de recuperación observado con G dividido 100
- S_{obs} = valor de recuperación observado: porcentaje de recuperación en el tratamiento combinado S+G

Se definió sinergismo cuando los valores del R resultaron mayores a 1, mientras que para un $R=1$ se consideró un efecto aditivo. Estos resultados mostraron que la combinación de G y S fue sinérgica ($R>1$) en la incorporación de acetato en LT, LI y en AG tanto en hígado como en tumor.

Tabla VI.2. Incorporación de [¹⁴C]acetato

	Hígado	Tumor
	Incorporación en LT (% del control)	
Control	100 ± 10.5	100 ± 8.6
G	98.9 ± 24.7	84.1 ± 26.0
S	117.5 ± 24.8	125.7 ± 29.22
S + G	14.3 ± 3.6**	39.1 ± 12.9**
R	8.1	2.7
	Incorporación en LI (% del control)	
Control	100 ± 10.9	100 ± 12.4
G	68.2 ± 7.6*	70.3 ± 19.1
S	86.5 ± 7.0	85.6 ± 19.1
S + G	14.9 ± 2.8***	38.5 ± 5.5*
R	4.0	1.6
	Incorporación en AG (% del control)	
Control	100 ± 12.2	100 ± 14.7
G	92.8 ± 22.3	54.0 ± 13.3
S	106.0 ± 29.8	140.2 ± 15.5
S + G	11.7 ± 3.7**	34,7 ± 7.9*
R	8.4	2.2

Se inyectó [¹⁴C]acetato tres horas previas al sacrificio de los ratones de los cuatro lotes ensayados, se midió la incorporación de marca radioactiva en lípidos totales (LT), ácidos grasos (AG) y lípidos insaponificables (LI) y se calculó el R de Kern. Los resultados se expresan como la media ± SEM, 5 < n < 20.

Efecto de la combinación de simvastatina y geraniol sobre el metabolismo lipídico y el crecimiento tumoral

Por último se determinó el efecto de la combinación de S + G sobre la colesterolemia, mostrando que si bien disminuye un 4% en los ratones tratados con S y G respecto a los animales con G, no hay diferencias significativas entre estos grupos. Sin embargo, hay una mayor significancia estadística del lote tratado con S + G respecto al control (Figura VI.4).

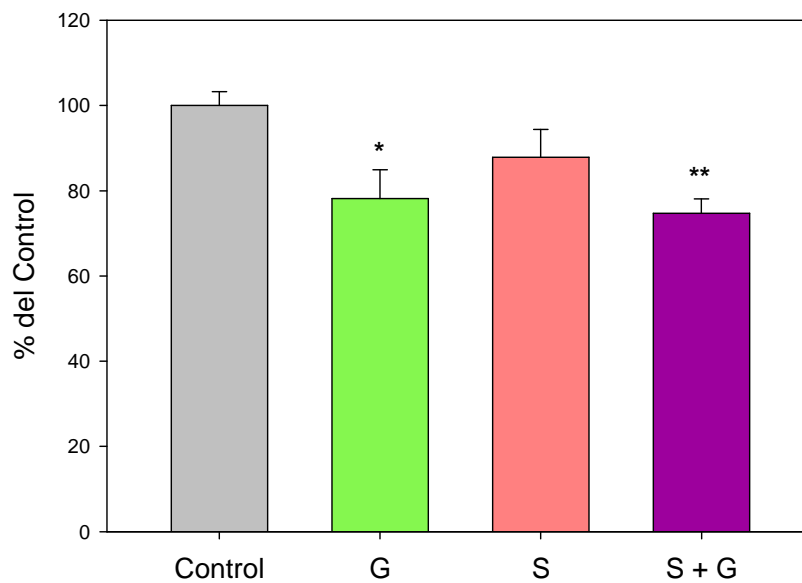


Figura VI.4. Colesterolemia. En suero obtenido al momento del sacrificio de los animales se determinó el contenido de colesterol. Los resultados se expresan como la media \pm SEM con $n \geq 21$, (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ con respecto al control.

VI.3. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente la actividad de HMGCR en los tejidos tumorales es elevada (Polo y col 1999; Elson y col. 1999) y la expresión de la enzima es resistente a la regulación por retroalimentación de esteroides (McAnally y col. 2007), por lo que se ha propuesto que la HMGCR ofrece un blanco novedoso y específico para los agentes quimioterapéuticos (Mo y Elson 2004). Se observó que se logró inhibir la enzima con G en animales portadores tanto en hígado como en tumor (Figura IV.6). El hecho de que la inhibición por estatinas se realice por un mecanismo diferente, nos hizo evaluar la posibilidad de que su administración en conjunto podría ser sinérgica.

Las estatinas han mostrado interactuar aditiva o sinérgicamente con otros agentes quimioterapéuticos, tales como cisplatino (Kozar y col. 2004), gemcitabina (Bocci y col. 2005) y tocotrienoles (McAnally y col. 2007; Wali y Sylvester 2007; Wali y col. 2009). Al analizar los resultados obtenidos podemos observar que hay una mayor inhibición de crecimiento y de actividad de Caspasa-3 en los animales tratados con la combinación de las drogas respecto a los que recibieron los componentes individuales, sin evidenciarse diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, la significancia del grupo al cual se le administra S y G es mayor (respecto al control) a partir del día 14 al analizar el crecimiento tumoral, por lo que se podría hablar de un efecto aditivo de los componentes. Pareciera que el efecto del G sobre la proliferación se debe fundamentalmente a la inhibición directa de la prenilación, más que a limitar los niveles de mevalonato, ya que se ha observado que cuando se restituyen los niveles de mevalonato en cultivos celulares tratados con G, la viabilidad no revierte (Crespo y col. 2013), lo que no ocurre con S (Cafforio y col. 2005). Probablemente la inhibición adicional de la síntesis de mevalonato por parte de S no proporciona un mayor aporte sobre la inhibición del crecimiento por lo cual no se observa un sinergismo como el demostrado en la síntesis de colesterol (Tabla

VI.2). Por otra parte, se podría pensar que la inhibición del crecimiento tumoral debido a la administración de G o S a las concentraciones ensayadas es tan potente que se dificulta mucho observar un efecto sinérgico, ya que para un $R=1$ debería esperarse que el crecimiento del tumor en animales tratados con S y G sea prácticamente nulo. De hecho, se observó un efecto sinérgico de S y G en cultivo celular de A549 donde las dosis utilizadas fueron subefectivas individualmente (resultados no mostrados).

En nuestros estudios se demuestra el efecto sinérgico de la combinación de simvastatina (estatina), y geraniol (monoterpeno), en lo correspondiente a la síntesis lipídica observada por una disminución de la incorporación de acetato en lípidos totales, lípidos insaponificables y ácidos grasos, tanto en hígado como en tumor de los animales portadores tratados con S y G. A las concentraciones ensayadas tanto S (50 mg / Kg peso / día) como G (50 mmol / Kg de alimento) no son capaces de disminuir significativamente la incorporación de acetato en LT y AG en hígado ni en LT, LI y AG en tumor. Sin embargo, la administración de ambas drogas en conjunto provocaron una disminución significativa de la síntesis lipídica tanto en los hígados como en los tumores. Si bien la disminución de la incorporación hepática de acetato en LI disminuye significativamente en los animales tratados con G (en un 31.8% respecto a los controles), la disminución es mucho mayor en los ratones que reciben la combinación de las drogas (85.1%). Asimismo se corrobora el sinergismo de S y G calculando el parámetro R que resulta mayor a 1 tanto en hígado como en tumor para todas las fracciones lipídicas donde se evalúa la incorporación de acetato (Tabla VI.2). Pese a esta fuerte inhibición de síntesis, no se obtuvieron diferencias en el contenido lipídico (CL, CE y TG) en los tejidos mencionados. El nivel de colesterol plasmático es menor y estadísticamente más significativo respecto al control en animales tratados con ambas drogas que los tratamientos individuales con S o G (Figura VI.4). Sin embargo, no es sustancialmente menor (sólo un 4%) que los animales tratados con G y no se observan diferencias significativas al compararse el

lote que recibió S + G, con los animales a los que se les administró S o G de manera independiente, lo cual indicaría que el fuerte sinergismo observado en la síntesis lipídica no se refleja directamente en el contenido lipídico ni en el colesterol plasmático. Debe tenerse en cuenta que no se restringe la fuente exógena de lípidos y que el efecto hipocolesterolemizante de las estatinas en roedores es escaso (Capítulo V).

Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron que el G es capaz de inhibir algún paso en la conversión de escualeno en colesterol a bajas dosis (Polo M y de Bravo 2006; Crespo y col. 2013), por lo que se propone que éste sumado a la inhibición de la HMGCR en forma competitiva por S y a nivel postranscripcional por G (como se plantea en el capítulo III) podrían ser, en su conjunto, los mecanismos probables del sinergismo. Es decir, si bien los dos componentes afectan la HMGCR, el mecanismo de inhibición es distinto (Figura VI.5). La S inhibe la actividad de la enzima competitivamente mientras que el G limita los niveles de la misma y podría modular también su actividad (Figura III.6). Además del efecto sobre la HMGCR que limita los niveles de mevalonato, se encuentran otros puntos de acción del G sobre la VM. Se afectaría directamente la prenilación de proteínas no sólo debido a una escasez de sustrato (FPP o GGPP), como se plantea para S, sino también a una inhibición directa de las proteínas preniltransferasas. Sumado a los bajos niveles de mevalonato producidos por la acción combinada de S y G, existe una inhibición adicional del G en algún/os pasos de la conversión de lanosterol en colesterol que sería la causa de la marcada inhibición de la síntesis de lípidos insaponificables (colesterol y precursores).

La aplicación clínica de las estatinas ha sido limitada debido a la toxicidad de dosis elevadas que puede conducir a rabdomiólisis e incluso la muerte (Thibault y col. 1996). Nuestros resultados pueden representar un enfoque potencialmente importante en futuros ensayos clínicos con estatinas en combinación con monoterpenos.

Efecto de la combinación de simvastatina y geraniol sobre el metabolismo lipídico y el crecimiento tumoral

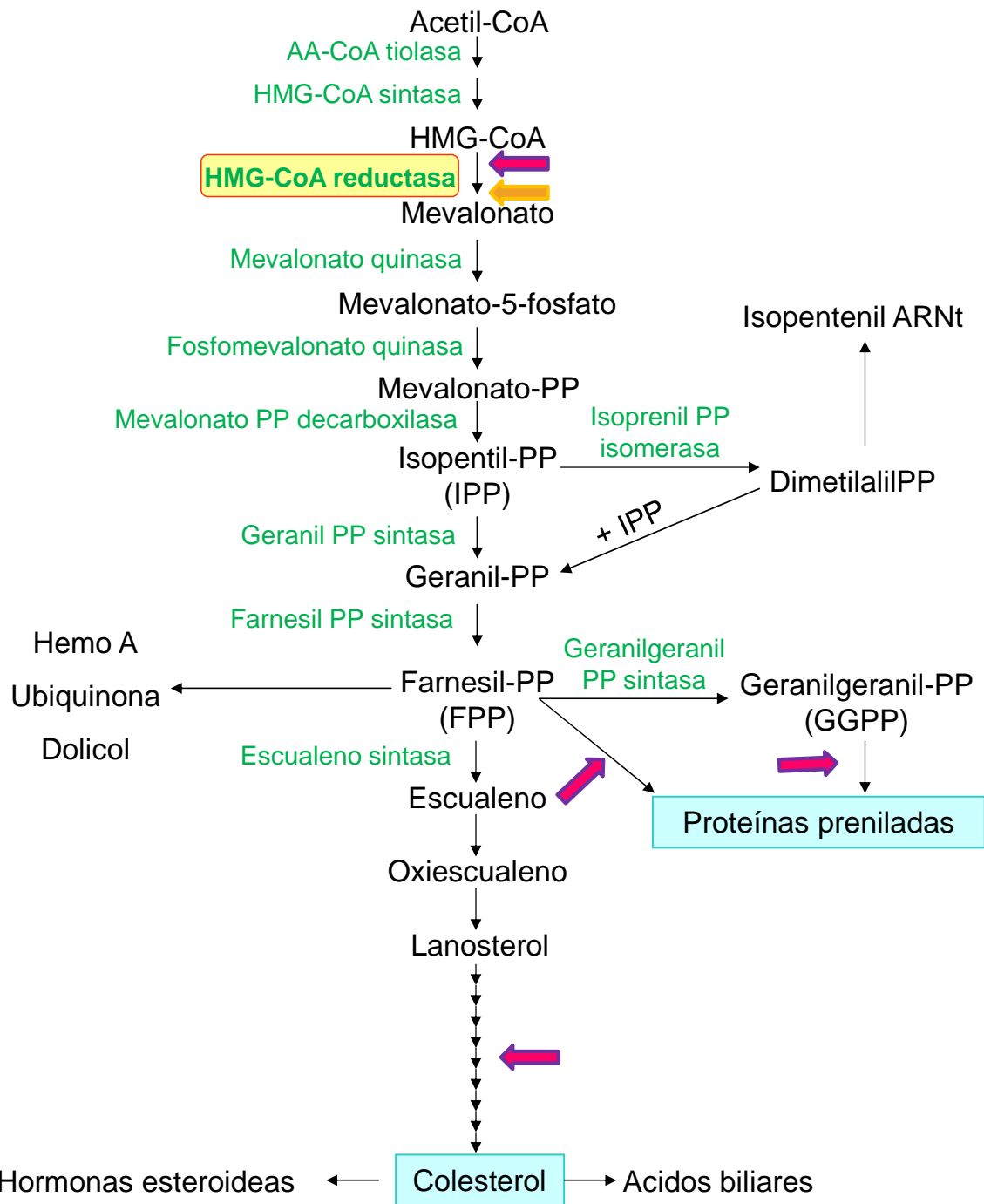


Figura VI.5. Puntos de Inhibición de la Vía del Mevalonato. Los componentes evaluados son capaces de modular la VM en distintos puntos. La S (flecha naranja) inhibe la HMGCR en forma competitiva mientras que el G (flecha rosa) modula la transcripción y la actividad de HMGCR, la preniltransferasa encargada de la prenilación de proteínas y uno o más pasos en la conversión de lanosterol en colesterol.

VII

Conclusiones

CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis:

- ✓ Hemos demostrado que el geraniol tiene efectos hipolipemiantes y antitumorales "in vivo" en ratones nude con dosis que no presentan toxicidad.
- ✓ Se avanzó en el conocimiento de los mecanismos de acción de este monoterpeno sobre la vía del mevalonato debido a que hemos demostrado:
 - Inhibición de la HMGCR a nivel postranscripcional, con una disminución de la cantidad y actividad de la enzima. Como consecuencia de ello disminuye la colesterogénesis en hígado y en tumor y aumenta la expresión del receptor de LDL hepático como mecanismo compensatorio al descenso del colesterol intracelular.
 - Inhibición de la cantidad de proteína Ras unida a membranas sin modificación de los niveles totales de la misma. Estos resultados sugieren una disminución de la prenilación por limitación en la disponibilidad de precursores o bien por inhibición directa de las preniltransferasas.
- ✓ Se demostró una disminución de la síntesis de ácidos grasos que sugiere un posible mecanismo responsable del efecto hipolipemiante ejercido por el geraniol.
- ✓ Se demostró un efecto proapoptótico y antiproliferativo del geraniol. A partir de nuestros resultados se sugiere que estos efectos se deberían a la limitación en la disponibilidad de lípidos esenciales para el crecimiento tumoral.

- ✓ La administración combinada de geraniol y simvastatina inhibió significativamente el crecimiento tumoral y la apoptosis, y demostró tener un efecto sinérgico sobre la inhibición de la síntesis de lípidos tanto hepáticos como tumorales. Esto reforzaría la hipótesis de la acción inhibitoria del geraniol en distintos puntos de vías del metabolismo lipídico.

Consideramos que la labor desarrollada en el presente trabajo colabora con una mejor comprensión de la acción de un componente muy frecuente en los aceites esenciales sobre una compleja vía metabólica, con el objetivo de mejorar el diseño de estrategias terapéuticas que incluyan el uso de compuestos naturales de manera individual o en combinación con drogas sintéticas para la lucha contra el cáncer y enfermedades asociadas a dislipemias.

VIII

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad S, Arjumand W, Seth A, Nafees S, Rashid S, Ali N, Sultana S. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology* 290(1): 69-81, 2011.
- Akira E, Yoshio T, Masao K, Kazuhiko T. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 575(2): 266-276, 1979.
- Al-Shurbaji A, Larsson-Backström C, Berglund L, Eggertsen G, Bjökhem I. Effect of n-3 fatty acids on the key enzymes involved in cholesterol and triglyceride turnover in rat liver. *Lipids* 26(5): 385-389, 1991.
- Bardou M, Barkun A, Martel M. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut* 59: 1572-1585, 2010.
- Bellini M. Efectos de inhibidores de la síntesis de colesterol sobre el crecimiento y el metabolismo lipídico de células tumorales. Biblioteca de la Facultad de Cs. Exactas (UNLP). Tesis de doctorado, 2003.
- Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q-biosynthesis and functions. *Biochemical and biophysical research communications* 396 (1): 74-79, 2010.
- Berndt N, Hamilton A, Sebti S. Targeting protein prenylation for cancer therapy *Nature Reviews Cancer* 11(11): 775-791, 2011.
- Bloch K. Biological synthesis of cholesterol. *Harvey Lectures* 48: 68-88, 1952.

- Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, et al. Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells. *Br J Cancer* 93: 319–330, 2005.
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering – are they clinically relevant? *Eur Heart J*.24(3): 225–48, 2003.
- Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, Sitaras N. Use of statins and breast cancer: a meta-analysis of seven randomized clinical trials and nine observational studies. *Journal of clinical oncology* 23(34): 8606-8612, 2005.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1): 248-254, 1976.
- Brown MS, Goldstein J L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 11041–11048, 1999.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-40, 1997.
- Bryan B, d'Amore P. What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(16): 2053-2065, 2007.
- Buhaescu I, Hassane I. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clinical biochemistry* 40 (9): 575-584, 2007.

- Burg, J, Espenshade P. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in Lipid Research* 50(4): 403-410, 2011.
- Burke Y, Stark M, Roach S, Sen S, Crowell P. Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids* 32(2): 151-156, 1997.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253, 2004.
- Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26(5): 883-891, 2005.
- Cardozo M, de Conti A, Ong T, Scolastici C, Purgatto E, Horst M, Bassoli B, Moreno F. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22(2): 130-135, 2011.
- Carnesecchi S, Schneider Y, Ceraline J, Durantou B, Gosse F, Seiler N, Raul F. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298(1): 197-200, 2001.
- Chadha A, Madyastha M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica* 14 (5): 365-374. 1984.
- Chang T, Chang C, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:129–57, 2006.

- Chaudhary S, Siddiqui M, Athar M, Alam M. Geraniol inhibits murine skin tumorigenesis by modulating COX-2 expression, Ras-ERK1/2 signaling pathway and apoptosis. *Journal of Applied Toxicology* Epub 33 (8): 828-837, 2013.
- Chen W, Viljoen A. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany* 76: 643–651, 2010.
- Chen S, Fu L, Raja S, Yue P, Khuri F, Sun S. Dissecting the roles of DR4, DR5 and c-FLIP in the regulation of Geranylgeranyltransferase I inhibition-mediated augmentation of TRAIL-induced apoptosis. *Molecular cancer* 9(1): 23, 2010.
- Cho K, Hill M, Chigurupati S, Du G, Parton R, Hancock J. Therapeutic levels of the hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor lovastatin activate Ras signaling via phospholipase D2. *Molecular and cellular biology* 31(6): 1110-1120, 2011.
- Chung M, Woo Park K, Heon Kim K, Kim C, Pill Baek J, Bang K, Lee S. Asian plantain (*Plantago asiatica*) essential oils suppress 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A reductase expression in vitro and in vivo and show hypocholesterolaemic properties in mice. *British Journal of Nutrition* 99(01): 67-75, 2008.
- Cortes V, Busso D, Mardones P, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biological Reviews* 2013.
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 229: 558–565, 1995.

- Crespo R, Montero Villegas S, Abba M, de Bravo M, Polo M. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways. *Biochem. Cell Biol.* 91(5):131-139; 2013.
- Christie William W, Xianlin Han. *Lipid analysis*. Vol. 338. Oxford: Pergamon Press, 1982.
- Cuello F, Kato C, Díaz S, Owen G. Efectos de las estatinas en cáncer: ¿potencial rol en terapéutica y prevención? *Revista médica de Chile* 141(2): 227-236, 2013
- Dallner G, Sindelar P. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3): 285-294, 2000.
- De Antueno R, Niedfeld G, De Tomas M, Mercuri O, Quintans C. Tumor lipids and liver lipid metabolism in the model human lung carcinoma/nude mice. *Biochemistry international* 14(6): 1097, 1987.
- De Backer G, Ambrosionie E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahime S, Faergemanc O, Grahame I, Manciae G, Manger Catsd V, Orth-Gomérg K, Perke J, Pyöräläe K, Rodiciof J, Sanse S, Sansoye V, Sechteme U, Silbere S, Thomsene T, Wood D European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 10 (1 suppl): S1-S78, 2003.

- de Bravo MG, Polo MP, Reggiani PV, Rimoldi OJ, Dardenne M, Goya RG. Partial prevention of hepatic lipid alterations in nude mice by neonatal thymulin gene therapy *Lipids* 41: 753-7, 2006.
- DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 18: 609–621, 2008.
- Demyttenaere J, Del Carmen Herrera M, De Kimpe N. Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 55: 363–373, 2000.
- Després J. Cardiovascular Disease Under the Influence of Excess Visceral Fat. *Critical Pathways in Cardiology* 6(2): 51-59, 2007.
- Dudley R, Anderson R. Separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin layer chromatography. *Lipids* 10 (2): 113-114; 1975.
- Duncan R, Lau D, El-Sohemy A, Archer M. Geraniol and β -ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Pharm.* 68(9):1739–1747, 2004.
- Duncan R, Archer M. Rats: Farnesol Decreases Serum Triglycerides in Rats: Identification of Mechanisms Including Up-Regulation of PPAR α and Down-Regulation of Fatty Acid Synthase in Hepatocytes. *Lipids* 43 (7): 619-627, 2008.
- Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 68: 157–185, 1999.

- Elson CE, Peffley DM, Hentosh P, Mo H. Isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis: potential application to cancer. *Proc Soc Exp Biol Med.* 221: 294–311, 1999.
- Espenshade P. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of cell science.* 119 (6): 973-976, 2006.
- Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 41: 401–427, 2007.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629–635, 2002.
- Farquhar J. The analysis of fatty acid mixtures by gas-liquid chromatography; construction and operation of an ionization chamber instrument *Nutrition reviews* 17.8, Suppl. 1, 1959.
- Flagan S. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res. (Camb)* 8: 295-309, 1966.
- Folch J, Solane M, Stanley G. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total lipids from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957.
- Gaw A. HDL-C and triglyceride levels: relationship to coronary heart disease and treatment with statins. *Cardiovasc Drugs Ther.* 17: 53-62, 2003.
- Goldstein J, DeBose-Boyd R, Brown M. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124(1): 35-46, 2006.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343(6257):425–430, 1990.

- Gough D, Hemming F. the characterization and stereochemistry of biosynthesis of dolichols in rat liver. *Biochem. J.* 118: 163-166, 1970.
- Gysin S, Salt M, Young A, Mc Cormic F. Therapeutic strategies for targeting Ras proteins. *Genes & Cancer* 2 (3): 359-372, 2011.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 574: 7–15, 2006.
- Harwood H, Alvarez IM, Noyes WD, Stacpoole PW. In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma. *J. Lipid Res.* 32: 1237–1252, 1991.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome research* 6(10), 986-994, 1996.
- Hinson DD, Chambliss KL, Toth MJ, Tanaka RD, Gibson KM. Posttranslational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res.*38(11): 2216–23, 1997.
- Horton J, Goldstein J, Brown M. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation* 109(9): 1125-1131, 2002.
- Houchens D, Ovejera A and Barker A. The use of Atimic Nude Mice in Cancer Reasearch (Houchens D. and Ovejera A., eds.) 267-289, 1978.
- Hu F, Willett C. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 288(20): 2569-2578, 2002.

- Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews Molecular cell biology* 9(2): 125-138, 2008.
- Istvan FS, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160-1164, 2001.
- Izumi S, Takashima O, Hirata T. Geraniol Is a Potent Inducer of Apoptosis-like Cell Death in the Cultured Shoot Primordia of *Matricaria chamomilla*. *Biochemical and biophysical research communications* 259(3): 519-522, 1999
- Jacobs EJ, Rodriguez C, Brady KA, Connell CJ, Thun MJ, Calle EE. Cholesterol-lowering drugs and colorectal cancer incidence in a large United States cohort. *J Natl Cancer Inst.* 98: 69-72, 2006.
- Jakobisiak M, Golab J. Statins can modulate effectiveness of antitumor therapeutic modalities. *Medicinal Research Reviews* 30 (1): 102-135, 2010.
- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 353: 417-439, 2001.
- Jin X, Sun J, Miao X, Liu G, Zhong D. Inhibitory effect of geraniol in combination with gemcitabine on proliferation of BXPc-3 human pancreatic cancer cells. *Journal of International Medical Research* 41(4): 993-1001, 2013.
- Jo Y, Debose-Boyd RA. Control of cholesterol synthesis through regulated ER associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45: 185-198, 2010.

- Joo J, Jetten A. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer letters* 287(2): 123-135, 2010.
- Jung, David H. Method for the quantitative determination of cholesterol. U.S. Patent No. 3,736,340. 29 May 1973.
- Kapur N, Musunur K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc. Health risk manag.* 4(2): 341-353, 2008.
- Karimi I, Hayatgheybi H, Razmjoo M, Yousefi M, Dadyan A, Hadipour M. Anti-hyperlipidaemic Effects of an Essential Oil of *Melissa officinalis* in Cholesterol-fed Rabbits. *Journal of Applied Biological Sciences* 4 (1): 17-22, 2010.
- Kawata S, Takaishi K, Nagase T, Ito N, Matsuda Y, Tamura S. Increase in the active form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human hepatocellular carcinoma: possible mechanism for alteration of cholesterol biosynthesis. *Cancer Res.* 50: 3270–3273, 1990.
- Kern D, Morgan C, Hildebrand-Zanki S. In vitro pharmacodynamics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine: synergy of antitumor activity with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 48: 117-121, 1988.
- Kikuchi T, Nagata Y, Abe T. In vitro and in vivo antiproliferative effects of simvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, on human glioma cells. *J Neurooncol.* 34(3): 233-9, 1997.
- Kim WS, Kim MM, Choi HJ, Yoon SS, Lee MH, Park K, Park CH, Kang WK. Phase II study of high-dose lovastatin in patients with advanced gastric adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 19: 81-3, 2001.

- King A, Dickinson J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis* Yeast, 16 (6): 499-506, 2000.
- Kozar K, Kaminski R, Legat M, et al. Cerivastatin demonstrates enhanced antitumor activity against human breast cancer cell lines when used in combination with doxorubicin or cisplatin. *Int J Oncol.* 24: 1149–1157, 2004
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H. Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors. *Cancer Res.* 61: 4885-91, 2001.
- Kwiterovich P. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *The American journal of cardiology* 86(12): 5-10, 2000.
- Lapczynski A, Bhatia S, Foxenberg R, Letizia C, Api A. Fragrance material review on geraniol. *Food and Chemical Toxicology* 46: S160–S170, 2008.
- Lowry O, Rosebrough J, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem.* 193(1): 265-275, 1951.
- Maddika S, Ande S, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* 10(1): 13-29, 2007.
- Mander EL, Dean RT, Stanley KK, Jessup W. Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1212 (1):80–92. 1994.

- Maneechotesuwan K, Ekjitrakul W, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes P. Statins enhance the anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids in asthmatic patients through increased induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (4): 754-762, 2010.
- Manning D, Reed N, Shaffer C. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin on congenitally athymic (nude) mice. *J. Exp. Med.* 138: 448-494, 1973.
- Manoharan S, Vasantha Selvan M. Chemopreventive potential of geraniol in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *J. Environ. Biol.* 33(2): 255, 2012.
- Maxfield F, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438: 612-621, 2005.
- Mc Gravery D, and Coteau R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026, 1995.
- McAnally JA, Gupta J, Sodhani S, Bravo L, Mo H. Tocotrienols Potentiate Lovastatin-Mediated Growth Suppression In Vitro and In Vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 523–31, 2007.
- Mennickent CS, Bravo DM, Calvo MC, Avello LM. Pleiotropic effects of statins. *Revista Médica de Chile* 136:775-82, 2008.
- Merajver S, Usmani S. Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 10(4): 291-298, 2005.

- Miziorko Henry M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505: 131–143, 2011.
- Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 229: 567-85; 2004.
- Mo H, Elson CE. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. *J Nutr.* 129: 804-813, 1999
- Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase – mevalonate-derived product inhibits translation of messenger-RNA and accelerates degradation of enzyme. *J Biol. Chem.* 263: 8929–8937, 1988.
- Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Qjm.* 98(12): 845-856, 2005.
- Omkumar RV, Darnay BG, Rodwell VW. Modulation of syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871. *J Biol Chem.* 269: 6810–6814, 1994.
- Ong T, Heidor R, de Conti A, Dagli M, Moreno F. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis* 27(6): 1194-1203, 2006.
- Pantelouris E. Absence of Thymus in a Mouse Mutant. *Nature* 217: 370-371, 1968.

- Paraskevas, Kosmas I. Statin treatment for rheumatoid arthritis: a promising novel indication. *Clinical rheumatology* 27.3: 281-287, 2008.
- Pattanayak M, Seth P, Smita S, Gupta S. Geraniol and Limonene Interaction with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reductase for their Role as Cancer Chemo-preventive Agents. *J Proteomics Bioinform.* 2: 466-474, 2009.
- Peffley D, Gayen A. Plant-Derived Monoterpenes Suppress Hamster Kidney Cell 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Synthesis at the Post-Transcriptional Level. *J. Nutr.* 133(1): 38-44; 2003.
- Polo M, Bravo MG de. Simvastatin effect on a human lung carcinoma and cholesterol homeostasis of host and non-host mice. *Arch Physiol Biochem.* 109(5): 435-40, 2001
- Polo M, de Bravo M, Carbone, C. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in liver of athymic mice with or without an implanted human carcinoma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 122(4): 433-437, 1999.
- Polo M, de Bravo M. Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem Cell Biol.* 84(1): 102-111; 2006.
- Polo, M. P., Crespo, R., Bravo, M. G. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell. Biochem. and Funct.* 29(6): 452-458; 2011.
- Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *The Lancet* 368(9531): 230-239, 2006.

- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 352: 2184–92, 2005.
- Rallidis L, Lekakis J, Kremastinos D. Current questions regarding the use of statins in patients with coronary heart disease. *International journal of cardiology* 122(3): 188-194, 2007.
- Ramos-Esquivel A, León-Céspedes C. Efectos no hipolipemiantes de las estatinas. *Acta Médica Costarricense* 49.4: 182-189, 2007.
- Ridley A. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114: 2713–2722, 2001.
- Ridley A. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 84: 13–19, 2004.
- Ros E. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev Esp Cardiol.* 6(Supl G):52-62, 2006.
- Rosenson R S. Current overview of statin-induced myopathy. *Am J Med.* 116: 408-416, 2004.
- Rozman D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacology & therapeutics.* 127(1), 19-40, 2010.
- Rygaard J. Heterotransplantation of a human malignant tumour to “nude” mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand* 77: 761-762, 1969.
- Sanossian N, Ovbiagele B. Drug Insight: translating evidence on statin therapy into clinical benefits. *Nature Clinical Practice Neurology* 4: 43-49, 2008.

- Sato R. SREBPs: protein interaction and SREBPs. *FEBS Journal*. 276(3): 622-627, 2009.
- Schreiber E, Matthias P, Muller M, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acid. Res.* 17 (15): 6419, 1989.
- Sebti S, Tkalcevic G, Jani J. Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Comm.* 3: 141-147, 1991.
- Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. Insig dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem.* 278: 52479–52490, 2003.
- Shimoyama S. Statins are logical candidates for overcoming limitations of targeting therapies on malignancy: their potential application to gastrointestinal cancers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67: 729–739, 2011.
- Shindo-Okada N, Takeuchi K, Han B, Nagamachi Y. Establishment of cell lines with high and low metastatic potential from A549 human lung carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 93, 1: 50-60, 2002.
- Song BL, Sever N, DeBose-Boyd RA. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell.* 19: 829–840, 2005.
- Stan S, Singh S, Brand R. Chemoprevention strategies for pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7(6): 347-356, 2010.

- Stancu C, Anca S. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of cellular and molecular medicine* 5 (4): 378-387; 2001.
- Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6519–6526, 2007.
- Swanson K, Hohl R. Anti-Cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Current Cancer Drug Targets* 6: 15-37, 2006.
- Tabas I. Cholesterol in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* 110(5): 583-590, 2002.
- Tall A. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the atheroprotective effect of high density lipoproteins. *Journal of internal medicine* 263(3): 256-273, 2008.
- Taylor F, Ward K, Moore T, Burke M, Davey S. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1, 2013.
- Thibault A, Samid D, Tompkins AC, et al. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 2: 483–491, 1996.
- Thurnher M, Gruenbacher G, Nussbaumer O. Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013.

- Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clinical Cancer Research*. 18(13): 3524-3531, 2012.
- Vallianou I, Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M. Camphene, a Plant-Derived Monoterpene, Reduces Plasma Cholesterol and Triglycerides in Hyperlipidemic Rats Independently of HMG-CoA Reductase Activity. *Plos One* 6(11) e20516, 2011,
- Van der Veen J, van Dijk T, Vrans, C, van Meer H, Bijsterveld K, Kuipers F. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 284(29): 19211-19219, 2009.
- Van der Wulp M, Verkade H, Groen A. Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 368: 1–16, 2013.
- Vigil D, Cherfils, J, Rossman K, Der C. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. *Nature Reviews Cancer* 10(12): 842-857, 2010.
- Zhong W, Wang C, Chang T, Lee W. Lovastatin Induces Apoptosis of Anaplastic Thyroid Cancer Cells via Inhibition of Protein Geranylgeranylation and de Novo Protein Synthesis. *Endocrinology* 144(9):3852–3859, 2003.
- Wali VB, Bachawal SV, Silvestre PW. Combined Treatment of g-Tocotrienol with Statins Induce Mammary Tumor Cell Cycle Arrest in G1. *Exp Biol Med*. 234: 639–650, 2009.

- Wali VB, Sylvester PW. Synergistic antiproliferative effects of g-tocotrienol and statin treatment on mammary tumor cells. *Lipids* 42: 1113–1123, 2007.
- Walker K, Olson M. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Current opinion in genetics & development* 15(1): 62-68, 2005.
- Wang D, Cohen D, Carey M. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *Journal of lipid research* 50(Supplement): S406-S411, 2009.
- Wang, Chih-Yuan, Hao-Ai Shui, and Tien-Chun Chang. "In vivo evidence of duality effects for lovastatin in a nude mouse cancer model." *International Journal of Cancer* 126 (2): 578-582, 2010.
- Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Chai Z. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters* 168(2): 176-185, 2007.
- Weis M, Heeschen C, Glassford A, Cooke J. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 105(6): 739-745, 2002.
- Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins *Pharmacol Ther.* 9: 995-112, 2003.
- Wilson R, Sargent J. High-resolution separation of polyunsaturated fatty acids thin layer chromatography. *Journal of chromatography* 623: 403-407; 1992.
- Wiseman D, Werner S, Crowell P. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21Cip1 and

p27Kip1 in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320(3): 1163-1170, 2007.

- Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of laboratory animal management and welfare*. John Wiley & Sons, 2013.
- Wolozin B. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron* 41(1): 7-10. 2004.
- Wright L, Philips M. Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* 47(5): 883-891, 2006.
- Wu J, Wong WW, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res.* 64: 6461-8, 2004.
- Zhou Q and Liao J. Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. *Curr Pharm Des.* 15(5): 467–478, 2009.