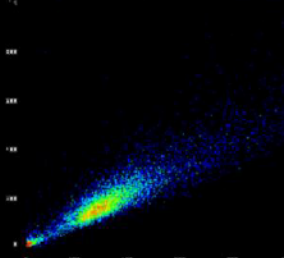
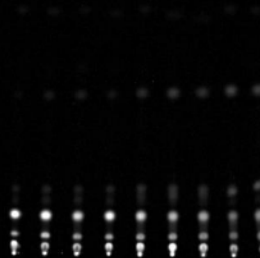
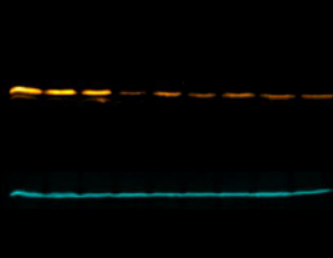
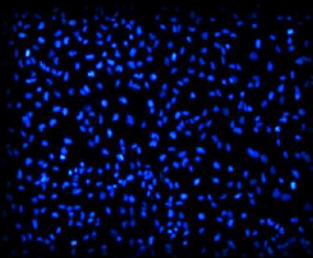
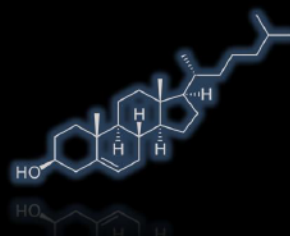


Mecanismos de acción de isoprenoides naturales y su combinación con estatinas sobre la proliferación y el metabolismo lipídico en distintos modelos celulares



Lic. Boris Rodenak Kladniew

2015

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas





Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

**Mecanismos de acción de isoprenoides naturales
y su combinación con estatinas sobre la
proliferación y el metabolismo lipídico en
distintos modelos celulares**

Lic. Boris Rodenak Kladniew

Director: Dra. Margarita García de Bravo

Co-director: Dra. Ana Ves Losada

2015

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) UNLP - CONICET CCT La Plata, bajo la dirección de la Dra. Margarita García de Bravo y la co-dirección de la Dra. Ana Ves Losada.

AGRADECIMIENTOS

A Maggie, por abrirme las puertas del laboratorio y acompañarme siempre en estos años. Por dejarme trabajar con libertad, equivocarme y volverlo a internar cuantas veces fuera necesario. Por nunca recibir un no como respuesta, intentando siempre que nunca nos falte nada. Por los momentos compartidos en viajes y paseos. Y por sobre todo, por hacer que el laboratorio de los “Margaritos” sea mucho más que un grupo de compañeros de trabajo.

A Moni por todo lo aprendido, tanto en la cocina del laboratorio como en la parte académica. Por enseñarme, un poco a escribir, un poco a discutir y sobre todo, a conjugar los tiempos verbales. Por su tiempo y dedicación en la corrección de mis escritos. Por ensañarme a sembrar en punto.

A Ro, nuestro comandante en jefe, porque a pesar de los chispazos, las discusiones y formas de pensar distintas, siempre tiramos para el mismo lado. Por contagiarme las ganas de querer mejorar, con lo mucho, poquito o nada que se tenga. Por permitirme creer que, a pesar de todas las dificultades, vaivenes, y cóleras del oficio, se puede seguir intentando hacer las cosas bien y con mucha garra.

A Charlie, Nela, Sandra y Agus por los momentos compartidos dentro y fuera del labo. Por la paciencia que me tuvieron, me tienen y espero me sigan teniendo un rato más. Por hacer que tantas horas compartidas sean lo más lejano a sentirse en un “trabajo”. Por las aventuras en SAIB (fuera de las salas de conferencias), sin dudas de los mejores “resultados” en estos años de trabajo. Por las charlas, viernes de facturas, Antares y demás momentos juntos.

A Moni H., Marisa y Santiago por ayudarme y ser parte de los resultados de este trabajo.

A toda la gente del INIBIOLP, en especial a Annie y Betina. Por ayudarme y aconsejarme cuando lo necesité. Por permitirme hacer uso y a veces “abuso” de sus laboratorios. Porque por diferentes razones, tienen mucho que ver en este ciclo que se cierra con este trabajo.

A los amigos del COEEL. Primero, por los momentos extra-laborales compartidos, por supuesto los más importantes, pero también porque verdaderamente siempre estuvieron ahí cuando necesité una mano, un consejo, una oreja. Por los mates uruguayos, cervezas artesanales y demás yerbas deliciosas.

A toda la gente del laboratorio de Hepatogastroenterología de la Universidad Católica de Lovaina en Bruselas. En especial al Dr. Peter Stärkel, por toda su generosidad desde el primer momento. Por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo sin siquiera conocerme. Por recibirme y tratarme de la mejor manera y por enseñarme mucho en tan poco tiempo. A la

Dra. Isabelle Leclercq por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme ser uno más del grupo. A Christine, simplemente por todo. Por trabajar conmigo codo a codo, por las muy buenas charlas, por regalarme su amistad desde un principio y seguir haciéndolo. A Noemi, en quien encontré una gran amiga, una persona genial que me ayudó y escuchó siempre, sobre todo en momentos poco felices. A ella y su familia, por los asados belgas y las reliquias cerveceras. A Jorge por su buena onda y sus palabras en español. A Laurence, MP, Nicolas, Valérie, Bénédicte, Vanessa, Regina, Ange Clarisse, Ivan y Natacha, muchas gracias a todos.

A la Universidad Nacional de La Plata, por darme la posibilidad de formarme y seguir creciendo como profesional y como docente. En particular a la Facultad de Ciencias Exactas que fue por muchos años mi segunda casa.

Al CONICET por permitirme concretar este doctorado y un poco más también. A Boeringher Ingelheim Funds por darme la posibilidad de viajar a Bélgica y vivir una experiencia increíble en muchos aspectos.

A los amigos que siempre están. A los viejitos: Cin, Clari, Jor, Mancho, Mari, Mauri, Ro y Sabri. A Maxi, Nico, amigos y hermanos de la vida. Simplemente gracias a todos por todo, feliz y orgulloso de que sean parte de mi vida.

A Esteban y su familia. Por hacer de mi estadía en Bruselas algo que jamás hubiera imaginado. Por regalarme su enorme, sincera e increíble amistad. Por hacerme sentir como en casa. Por los momentos compartidos, las cenas de lujo, los paseos por Lovaina y mucho mas. Por ser unos "fuera de serie".

A mis viejos por haberme dado la posibilidad de estudiar y de elegir. Por acompañarme siempre. Porque gracias a ellos hoy soy lo que soy y hago lo que me gusta.

A Dani, Ger y Nir, mis hermanos-amigos y amigos-hermanos. Por estar siempre ahí, en las buenas y en las no tanto. Por bancarme y quererme tal cual soy. Por las charlas, viajes, reuniones y los mixtos compartidos. Por hacer el esfuerzo para entenderme cuando hablo de trabajo. Simplemente por ser como son y estar a mi lado.

A la familia de Piru, por todos los momentos lindos que me permiten compartir con ellos, por adoptarme y malcriarme. A todos y en especial a Cande, Delfi y Emma por ser nuestro cable a tierra, regalarnos y contagiarnos toda su alegría.

A Piru, por ponerle mucho color a mi días. Por la paciencia y el amor que me tiene. Por acompañarme en las aventuras y desventuras, a lo largo de todo este proceso y siempre. Por lo que compartimos día a día, por las experiencias únicas que vivimos juntos y por todo lo que está por venir.

Publicaciones durante el período de doctorado

Relacionados con esta tesis:

- **Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole and simvastatin on human cell lines.** Rodenak Kladniew B, Polo M, Montero Villegas S, Galle M, Crespo R, García de Bravo M. *Chemico-Biological Interactions*, 214 (2014): 57–68.
- **Actividad antiproliferativa y anticolesterogénica de estatinas y monoterpenos.** Polo M, Crespo R, Galle M, Rodenak Kladniew B, Montero Villegas S, García de Bravo M. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 47 (2013): 343-351.

No presentados en esta tesis:

- **Suppression by geraniol of the growth of A549 human-lung adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and in vivo: potential use in cancer chemotherapy.** Galle M, Crespo R, Rodenak Kladniew B, Montero Villegas S, Polo M, García de Bravo M. *Nutrition and Cancer*, 66 (2014): 888-895.
- **Modulation by Geraniol of gene expression involved in lipid metabolism leading to a reduction of serum-cholesterol and triglyceride levels.** Galle M, Rodenak Kladniew B, Castro MA, Montero Villegas S, Lacunza E, Polo M, García de Bravo M, Crespo R. *Enviado*.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. RELEVANCIA DEL TEMA	19
1.2. VÍA DEL MEVALONATO.....	21
1.3. REGULACIÓN DE VÍA DEL MEVALONATO	27
1.4. METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	31
1.5. VÍA DEL MEVALONATO Y CÁNCER.....	36
1.6. ISOPRENOIDES NATURALES.....	42
1.6.1. Linalool.....	43
1.6.2. 1,8-cineole.....	44
1.7. ESTATINAS.....	45
1.7.1. Simvastatina.....	47
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. SELECCIÓN DE ISOPRENOIDES Y ESTATINAS.....	52
3.2. MATERIALES	52
3.3. CULTIVO CELULAR	53
3.3.1. Línea celular HepG2	53
3.3.2. Línea celular A549	54
3.3.3. Condiciones de cultivo celular.....	55
3.3.4. Tratamiento de las células	56
3.4. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	56
3.4.1. Ensayo de MTT	56
3.4.2. Ensayo de Rojo Neutro.....	57
3.4.3. Recuento celular	58
3.5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	59
3.6. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS	60
3.6.1. Actividad de Caspasa-3	60
3.6.2. Ensayo de TUNEL.....	60
3.7. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES.....	61

3.7.1. Separación de lípidos neutros	61
3.7.2. Cuantificación de lípidos neutros y fosfolípidos	63
3.7.2.1. Triacilglicéridos	63
3.7.2.2. Fosfolípidos	64
3.7.2.3. Colesterol libre y esterificado.....	64
3.8. INCORPORACIÓN DE ¹⁴ C-ACETATO EN LÍPIDOS TOTALES, LÍPIDOS INSAPONIFICABLES Y ÁCIDOS GRASOS	64
3.8.1. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos insaponificables y ácidos grasos.....	65
3.8.2. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos neutros y polares	65
3.9. INCORPORACIÓN Y EXPORTACIÓN DE ³ H-COLESTEROL.....	66
3.9.1. Incorporación de ³ H-colesterol.....	66
3.9.2. Exportación de ³ H-colesterol.....	67
3.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	67
3.10.1. Cuantificación de proteínas totales	67
3.10.1.1. Método de Lowry	67
3.10.1.2. Método de Bradford	68
3.10.2. Procesamiento de las muestras para su posterior separación por electroforesis desnaturalizante y cuantificación de proteínas específicas por Western blot	68
3.10.2.1. HMGCR.....	68
3.10.2.2. Caspasa-3	69
3.10.2.3. Ras.....	69
3.10.3. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	69
3.10.4. Western blot	70
3.11. ANÁLISIS DE SINERGISMO	71
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
4. EFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR: MECANISMOS DE ACCIÓN.....	73
4.1. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR	74
4.1.1. Ensayo de MTT	74
4.1.2. Ensayo de Rojo Neutro.....	76
4.1.3. Recuento celular	77

4.2. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LINALOOL Y 1,8-CINEOLE	78
4.2.1. Determinación de apoptosis	78
4.2.1.1. Estudio del clivaje de caspasa-3	79
4.2.1.2. Evaluación de la actividad de caspasa-3.....	80
4.2.1.3. Detección de células apoptóticas mediante el ensayo de TUNEL	81
4.2.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	86
4.2.3. Adición de mevalonato exógeno	88
4.2.4. Análisis de Ras en las fracciones subcelulares.....	89
4.3. EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE A PARES ENTRE LINALOOL, 1,8-CINEOLE Y SIMVASTATINA....	91
4.3.1. Proliferación y viabilidad celular	91
4.3.2. Determinación de apoptosis por el método de TUNEL	94
4.3.3. Análisis del ciclo celular.....	96
4.3.4. Efecto de la combinación de linalool y simvastatina sobre la distribución subcelular de Ras.....	97
4.4. DISCUSIÓN	99
5. EFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO: MECANISMOS DE ACCIÓN.....	108
5.1. EFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE LA VÍA DEL MEVALONATO	109
5.1.1. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables	109
5.1.2. Niveles de HMGCR	119
5.2. ACCIÓN DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS NEUTROS, FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS	121
5.2.1. Contenido de colesterol	121
5.2.2. Incorporación y exportación de ³ H-colesterol.....	122
5.2.3. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos neutros y polares	123
5.2.3.1. Ácidos grasos y lípidos totales.....	124
5.2.3.2. Lípidos neutros.....	125
5.2.3.3. Fosfolípidos	126
5.2.4. Contenido de triacilglicéridos y fosfolípidos.....	127
5.3. EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE A PARES ENTRE LINALOOL, 1,8-CINEOLE Y SIMVASTATINA..	129
5.3.1. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos de la vía del mevalonato	129

5.3.2. Niveles de HMGCR	134
5.3.3. Efecto sobre el contenido de lípidos neutros y polares.....	136
5.3.3.1. Colesterol libre y esterificado.....	136
5.3.3.2. Triacilglicéridos y fosfolípidos	136
5.4. DISCUSIÓN	139
6. CONCLUSIONES FINALES.....	147
Apéndices	154
I. Determinación de la densidad celular óptima para sembrar al inicio de los experimentos	155
II. Valores de IC50 determinados a 24 y 48 horas en medio MEM suplementado con 10% SFB por el ensayo de MTT.....	156
Referencias.....	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Lista de anticuerpos empleados y sus diluciones	70
Tabla 4.1. Actividad antiproliferativa del linalool, 1,8-cineole y simvastatina en células HepG2 y A549. .	78
Tabla 4.2. Incapacidad del mevalonato exógeno de revertir el efecto inhibitorio provocado por linalool y 1,8-cineole sobre la proliferación en células HepG2 y A549	88
Tabla 4.3. Combinaciones múltiples de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina a diferentes concentraciones	93
Tabla 4.4. Efecto de las combinaciones de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre el ciclo celular en células A549.....	96
Tabla 5.1. Contenido de TAG y FLT en células HepG2 tratadas con las combinaciones de a pares de linalool, 1,8-cineole y simvastatina	138
Tabla 7.1. Valores de IC50 determinados a 24 y 48 horas en medio MEM suplementado con 10% SFB por el ensayo de MTT	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales causas definidas de muerte en Argentina de 2000 a 2012	19
Figura 1.2. Vía del mevalonato	26
Figura 1.3. Regulación de la vía del mevalonato	30
Figura 1.4. Estructura de la molécula de colesterol y su disposición en la membrana plasmática	32
Figura 1.5. Transporte de colesterol	35
Figura 1.6. Vías de señalización de Ras.	38
Figura 1.7. Dominio C-terminal de las proteínas Ras	39

Figura 1.8. Modificaciones postraduccionales en proteínas de la familia Ras	40
Figura 1.9. Linalool.....	43
Figura 1.10. 1,8-cineole.....	44
Figura 1.11. Estatinas	46
Figura 3.1. Morfología típica de células HepG2 observadas al microscopio óptico en condiciones normales de cultivo	54
Figura 3.2. Células A549 observadas al microscopio óptico en condiciones de cultivo estándar	55
Figura 3.3. Transformación del MTT en formazán	57
Figura 3.4. Metodología utilizada para recuento celular	58
Figura 3.5. Análisis del ciclo celular.....	59
Figura 3.6. Localización de especies lipídicas coloreadas con yodo.....	63
Figura 4.1. Efecto del linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la viabilidad de células HepG2 y A549 determinada por el ensayo de MTT.	75
Figura 4.2. Inhibición de la viabilidad celular mediada por linalool, 1,8-cineole y simvastatina determinada por el ensayo de RN.....	76
Figura 4.3. Inhibición de la proliferación de células HepG2 y A549 determinada por recuento celular ...	77
Figura 4.4. Western Blot de caspasa-3 en células HepG2 y A549.	80
Figura 4.5. Actividad de caspasa-3 en células HepG2	81
Figura 4.6. Apoptosis determinada por ensayo de TUNEL en células HepG2.	83
Figura 4.7. Apoptosis determinada por ensayo de TUNEL en células A549.....	84
Figura 4.8. Porcentaje de células apoptóticas determinadas mediante ensayo de TUNEL.....	85
Figura 4.9. Arresto del ciclo celular mediado por linalool y 1,8-cineole en células HepG2 (A) y A549 (B).....	87
Figura 4.10. Obtención de las fracciones subcelulares citosólica y de membrana.	89
Figura 4.11. Efecto del linalool sobre los niveles de Ras y su traslocación a membrana en células HepG2.	90
Figura 4.12. Efecto de la combinación de linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la viabilidad y proliferación de células HepG2 (A) y A549 (B).....	92
Figura 4.13. Efecto de la combinación de linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre inducción de apoptosis.....	95
Figura 4.14. Efecto de la combinación de linalool y simvastatina sobre la expresión de los niveles de Ras y su traslocación a membrana en células HepG2.....	98
Figura 5.1. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables separados mediante TLC y revelados por autorradiografía.	110
Figura 5.2. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole.	113
Figura 5.3. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de células A549 tratadas con linalool y 1,8-cineole.	114

Figura 5.4. Lípidos insaponificables no identificados de la vía del mevalonato.	117
Figura 5.5. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos insaponificables de la vía del mevalonato no identificados.....	118
Figura 5.6. Efecto del linalool y 1,8-cineole sobre los niveles de HMGCR en células HepG2.	120
Figura 5.7. Determinación del contenido de colesterol en células HepG2 y A549 tratadas con linalool y 1,8-cineole..	122
Figura 5.8. Incorporación y exportación de ³ H-colesterol en células incubadas con linalool y 1,8-cineole.....	123
Figura 5.9. Separación e identificación de lípidos neutros y polares radiactivos.....	124
Figura 5.10. Incorporación de ¹⁴ C-acetato ácidos grasos y LIT en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole.....	125
Figura 5.11. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en lípidos neutros en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole.....	126
Figura 5.12. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en fosfolípidos en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole.....	127
Figura 5.13. Determinación del contenido de triacilglicéridos y fosfolípidos en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole.	128
Figura 5.14. Incorporación de ¹⁴ C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de la vía del mevalonato en células tratadas con simvastatina.....	130
Figura 5.15. Efecto de la combinación entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos de la VM en células HepG2.....	132
Figura 5.16. Efecto de la combinación entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos de la VM en células A549..	133
Figura 5.17. Efecto de la combinación de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre los niveles de HMGCR en células HepG2..	135
Figura 5.18. Efecto combinado del linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre el contenido de colesterol en células HepG2 (A) y A549 (B).	137
Figura 5.19. Degradación de HMGCR mediada por lanosterol y 24,25-EC.....	142
Figura 5.20. Activación de la expresión de genes regulados por SREBP-2 en respuesta a niveles bajos de colesterol intracelular.	144
Figura 6.1. Modelo propuesto para la regulación de la vía del mevalonato mediado por linalool y 1,8-cineole en células HepG2..	153
Figura 7.1. Determinación de la densidad celular óptima para la siembra inicial de células HepG2 y A549.	155

ABREVIATURAS

7-DHC	7-dehidrocolesterol
24,25-EC	24(S),25-epoxicolesterol
Ac-DEVD-pNA	acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilina
ASB	albúmina sérica bovina
AGL	ácidos grasos libres
AGT	ácidos grasos totales
CDK	quinasa dependiente de ciclina (del inglés <i>cyclin dependent kinase</i>)
CE	colesterol esterificado
CL	colesterol libre
CN	1,8-cineole
DAG	diacilglicéridos
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DHCR7	7-dehidrocolesterol reductasa
DHCR24	esterol- Δ 24-reductasa
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DOS	2,3; 22,23-diepoxiescualeno
DFG	difosfatidilglicerol
ECV	enfermedades cardiovasculares
EDTA	ácido etilen-diamin-tetra-acético
FAS	ácido graso sintasa (del inglés <i>fatty acid synthase</i>)
FC	fosfatidilcolina
FE	fosfatidiletanolamina
FL	fosfolípidos
FLT	fosfolípidos totales
FPP	farnesil pirofosfato
FS	fosfatidilserina
FTasa	farnesiltransferasa
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
GGTasa	geranilgeraniltransferasa
GPP	geranil pirofosfato
HCC	carcinoma hepatocelular (del inglés <i>Hepatocellular Carcinoma</i>)
HDL	lipoproteína de alta densidad (del inglés <i>high density lipoprotein</i>)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HMGCS	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa

IC50	concentración que inhibe el 50% de la proliferación celular
IC50sc	concentración que inhibe el 50% la síntesis de colesterol
IP	ioduro de propidio
IPP	isopentenil pirofosfato
LDL	lipoproteína de baja densidad (del inglés <i>low density lipoprotein</i>)
LDL-C	LDL-colesterol
LDLR	receptor de LDL
LIT	lípidos insaponificables totales
LN	linalool
LPL	lipoproteín lipasa
LT	lípidos totales
MEM	medio esencial mínimo
MK	mevalonato quinasa (del inglés <i>mevalonate kinase</i>)
MOS	2,3-monoepoxiesqualeno
MP	membrana plasmática
MPP	bifosfomevalonato
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazolio
NL	lípidos neutros (del inglés <i>neutral lipids</i>)
OSC	2,3-oxidoesqualeno: lanosterol ciclasa
PBS	buffer fosfato salino (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCT	proteína celular total
Pi	fósforo inorgánico
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés <i>phosphatidylinositol 3- kinase</i>)
PMK	fosfomevalonato quinasa (del inglés <i>phosphomevalonate kinase</i>)
p-NA	p-Nitroanilina
PPTasa	preniltransferasa
QM	quilomicrones
RC	recuento celular
RCE1	endopeptidasa convertidora de RAS (del inglés <i>Ras-converting enzyme1</i>)
RE	retículo endoplásmico
RN	rojo neutro
Scap	proteína que activa SREBP mediante clivaje (del inglés <i>SREBP cleavage activating protein</i>)
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SREBP	proteína de unión al elemento regulador de esteroides (del inglés <i>sterol regulatory element binding protein</i>)
SS	esqualeno sintasa

SV	simvastatina
T°A	temperatura ambiente
TdT	desoxinucleotidil transferasa terminal
TAG	triacilglicéridos
TLC	cromatografía en capa fina (del inglés <i>thin layer chromatography</i>)
Tiolasa	acetil-coenzima A tiolasa
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés <i>very low density lipoprotein</i>)
VM	vía del mevalonato

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antiproliferativa, antiolesterolizante y los efectos sobre el metabolismo lipídico de dos isoprenoides de 10 carbonos, linalool (monoterpeno alcohol lineal) y 1,8-cineole (monoterpeno cíclico con grupo éter), sobre células HepG2 (procedentes de un hepatocarcinoma humano) como modelo de célula hepática y A549 (provenientes de adenocarcinoma de pulmón humano) como tipo celular extra-hepático. Se analizaron los mecanismos de acción involucrados y los efectos del tratamiento combinado de ambos monoterpenos entre sí o de cada monoterpeno con simvastatina (una estatina modelo) evaluando los posibles efectos sinérgicos de cada interacción. La actividad de los isoprenoides naturales sobre la colesterolización y proliferación celular se concentra en la vía del mevalonato (VM), una vía metabólica muy compleja indispensable para la homeostasis celular. Esto se debe a que la VM no solo es la vía de síntesis del colesterol, sino que además provee intermediarios fundamentales para la prenilación de proteínas de la superfamilia Ras, proteínas reguladoras de la proliferación y supervivencia celular.

Durante el desarrollo de este trabajo se determinó la viabilidad y proliferación celular por los métodos de MTT, rojo neutro y recuento celular. En todos los casos, tanto los monoterpenos como la simvastatina inhibieron la proliferación celular, mientras que las combinaciones de a pares entre monoterpenos y cada uno de ellos con simvastatina mostraron un efecto sinérgico en dicha inhibición. Se estudió la distribución de las poblaciones en el ciclo celular, apoptosis por diferentes metodologías y la localización subcelular de Ras, a diferentes concentraciones. Tanto linalool como 1,8-cineole arrestaron el ciclo celular, principalmente en G0/G1 mientras que linalool también indujo apoptosis en células HepG2. Al combinar los compuestos se observó en gran parte de los casos una interacción sinérgica sobre la inducción de apoptosis. Linalool disminuyó los niveles de Ras en membrana plasmática y los aumentó en citosol, mientras que al combinarse con simvastatina, la inhibición de la traslocación a membrana fue levemente potenciada.

A través de experimentos de incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos en condiciones donde la proliferación no se encuentra afectada, se demostró que linalool y 1,8-cineole inhibieron la VM, probablemente a diferentes niveles. Esto resultó en una reducción de la colesterolización y una acumulación de intermediarios y/u otros productos finales de la vía. Las concentraciones efectivas en la inhibición de la síntesis de colesterol fueron considerablemente inferiores a las necesarias para ejercer efecto antiproliferativo, sobre todo para 1,8-cineole. En ciertos casos, los tratamientos aumentaron la incorporación de colesterol exógeno. Ambos monoterpenos afectaron la incorporación de acetato en lípidos neutros, fosfolípidos y ácidos grasos, cada uno de manera diferente. La combinación de ambos isoprenoides entre sí, o de cada uno con simvastatina, inhibió sinérgicamente la síntesis de colesterol. A bajas concentraciones linalool y 1,8-cineole bloquearon etapas específicas de la colesterolización mientras que a concentraciones elevadas provocaron una inhibición de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), enzima limitante de la velocidad de la VM. El agregado de mevalonato exógeno fue incapaz de revertir la inhibición de la proliferación promovida por ambos compuestos, lo que demuestra que la inhibición de HMGCR por sí sola no es responsable de tal efecto y refuerza la hipótesis de la inhibición a nivel de la prenilación de proteínas como principal mecanismo antiproliferativo.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis contribuyen a un mejor entendimiento de la acción de linalool y 1,8-cineole sobre la VM aportando conocimiento sobre los posibles mecanismos involucrados en su actividad antiolesterolizante y antiproliferativa. También sugieren el potencial uso de estos compuestos como una alternativa natural para ser utilizados en terapias contra cáncer y/o enfermedades cardiovasculares, ya sea solos, combinados entre sí o con estatinas.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. RELEVANCIA DEL TEMA

El exceso de colesterol en sangre (hipercolesterolemia) formando parte de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) está íntimamente ligado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Weingartner et al. 2010; Barter 2011; Tuteja et al. 2014). Entre las causas más importantes de ECV se encuentra la aterosclerosis, una alteración degenerativa que afecta a las arterias en las que se forman placas de ateroma. Estas placas son depósitos de diversos lípidos, especialmente colesterol, proteínas y sales de calcio que obstruyen total o parcialmente la luz de las arterias ocasionando falta o disminución de irrigación. Como consecuencia puede producirse: angina de pecho, infarto de miocardio, hemorragias y trombosis cerebrales, aneurismas y dilataciones excesivas de la aorta, entre otras (Baigent et al. 2005; Cuello et al. 2013; Taylor et al. 2013).

En nuestro país, las ECV aún persisten como la principal causa de muerte para la población en general y sin cambios en la tendencia de su tasa de mortalidad específica (Figura 1.1) (Gilardon 2005; www.deis.gov.ar 2014).

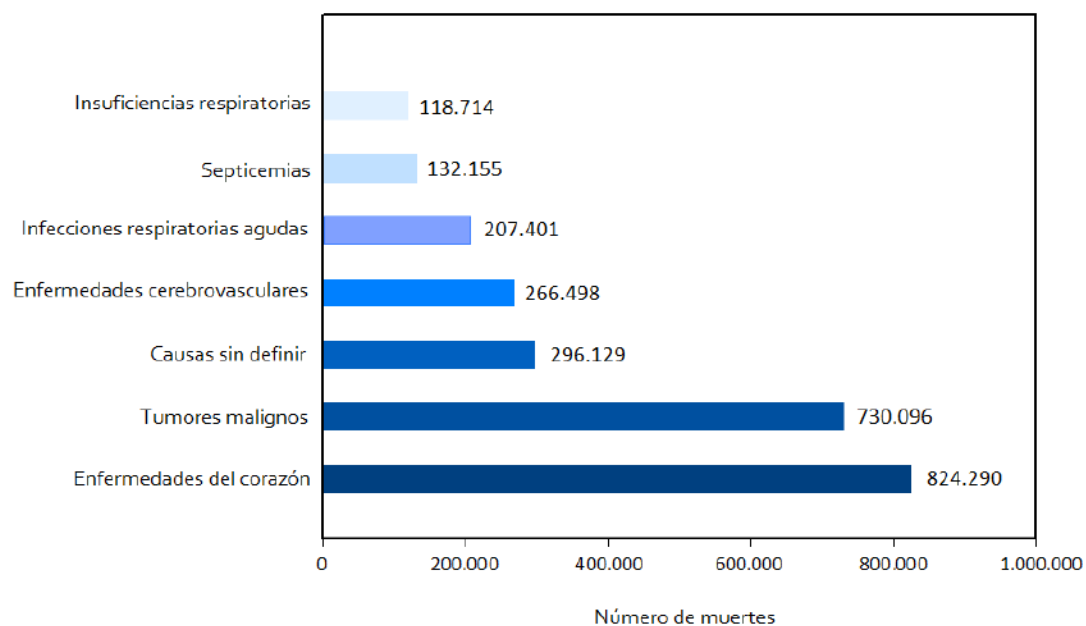


Figura 1.1. Principales causas definidas de muerte en Argentina de 2000 a 2012. Estas cifras fueron obtenidas a partir de datos oficiales publicados por la Dirección de Estadísticas e Información de Salud del Ministerio de Salud de la Nación (DEIS, www.deis.gov.ar). Entre las ECV se incluyen las enfermedades del corazón y las enfermedades cerebrovasculares.

La utilidad de las estatinas como drogas hipocolesterolemiantes está ampliamente comprobada (Baigent et al. 2005; Kearney et al. 2008; Brugts et al. 2009; Pastori et al. 2015). Se ha demostrado que la administración de estatinas disminuye los riesgos de padecer ECV (Group 1994; Kaminsky et al. 2010; Taylor et al. 2013), aun en pacientes con niveles normales de colesterol (Yusuf 2002; Liao et al. 2005). Las estatinas inhiben competitivamente la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), enzima limitante de la velocidad de la vía de síntesis del colesterol, también llamada vía del mevalonato (VM).

En una población occidental como la nuestra, en la que los hábitos de alimentación traen aparejado altas probabilidades de tener elevados niveles de colesterol sérico, son cada vez más las personas medicadas (o que deberían serlo) con estatinas. Esto implica un enorme costo económico ya sea privado o estatal. De modo que, la posibilidad de disminuir la dosis efectiva de estatinas por complemento o suplemento dietario emerge como una alternativa seductora tanto desde el punto de vista terapéutico (disminución de efectos secundarios) como del económico.

La posibilidad de utilizar isoprenoides naturales como drogas hipocolesterolemiantes surge de la capacidad de algunos de ellos de inhibir la HMGCR. Estos compuestos actuarían por un mecanismo distinto al de las estatinas, inhibiendo a la enzima a nivel traduccional y postraduccional y no de manera competitiva (Ren et al. 1994; Peffley et al. 2003; Polo et al. 2006; Crespo et al. 2013).

Por otro lado, los decesos ocasionados por tumores malignos representan la segunda causa de muerte en Argentina (Figura 1.1) (www.deis.gov.ar 2014). La vinculación entre la VM y el crecimiento y proliferación de células neoplásicas está ampliamente documentada. El nexo principal entre ambos son las proteínas isopreniladas relacionadas a Ras que unen GTP (GTPasas pequeñas). Algunas de ellas regulan el crecimiento y/o transformación celular, de modo que la inhibición de la prenilación de una o más de estas proteínas se traduce en una disminución del crecimiento y proliferación celular (Swanson et al. 2006; Thurnher et al. 2013; Jiang et al. 2014).

Ya que las estatinas son capaces de inhibir la prenilación de proteínas (Ghittoni et al. 2005; Roy et al. 2011; Afshordel et al. 2015) existe un interés creciente en su utilización como

agentes antiproliferativos en el tratamiento del cáncer. La principal desventaja que presentan es que las concentraciones requeridas para lograr un efecto antiproliferativo son aproximadamente 100 veces superiores a las necesarias para inhibir la síntesis de colesterol (Osmak 2012). Esto limitaría su utilización como agente único debido a la elevada toxicidad asociada, por lo que se propone su uso en combinación con otros fármacos (McAnally et al. 2007; Staedler et al. 2012; Sylvester 2012).

Algunos isoprenoides naturales han mostrado ser eficaces en la inhibición de la prenilación de proteínas, no sólo por inhibir a la HMG-CoA reductasa, sino también actuando a nivel de las prenil:protein transferasas a través de un mecanismo desconocido. La inhibición de la prenilación de proteínas tiene cierta especificidad por proteínas de 21-26 KDa, grupo dentro del cual se encuentran todas las proteínas oncogénicas conocidas (Crowell et al. 1991; Ren et al. 1997; Hardcastle et al. 1999; Afshordel et al. 2015). Además, poseen algunas de las características que deben tener los agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos: eficaz actividad antitumoral, disponibilidad comercial, bajo costo, biodisponibilidad oral y baja toxicidad.

Por estas razones es que la utilidad de isoprenoides naturales como agentes con propiedades anticolesterogénicas y antiproliferativas se ha convertido en un área de gran interés y creciente estudio. El uso combinado de isoprenoides con estatinas nace como una alternativa promisoriosa para el tratamiento de ambas patologías.

1.2. VÍA DEL MEVALONATO

La VM (Figura 1.2) es una vía metabólica compleja que provee a la célula de moléculas bioactivas esenciales que participan en múltiples procesos celulares, entre las cuales se destacan isoprenoides esteroideos, como el colesterol, productos no esteroideos como dolicol, ubiquinona, hemo-A e isopenteniladenina, e intermediarios como farnesil pirofosfato y geranylgeranyl pirofosfato (Goldstein et al. 1990; Buhaescu et al. 2007; Shi et al. 2013).

Esta vía, de la que participan componentes citoplasmáticos y microsomales, y que virtualmente tiene lugar en todas las células de mamífero, fue dilucidada a partir de los trabajos

en células hepáticas de mamífero realizados por Bloch, Popjak, Cornforth, Porter y otros (Popjak et al. 1961; Bloch 1965; Beytia et al. 1976). Comienza en el citosol con la síntesis de acetoacetil-CoA a partir de la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA, sillares estructurales del esqueleto carbonado de todos los esteroides producidos por la vía, en una reacción catalizada por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa (Tiolasa). Seguidamente, una molécula de acetoacetil-CoA vuelve a combinarse con otra de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por acción de la HMG-CoA sintasa (HMGCS). Luego se produce la conversión de HMG-CoA en mevalonato (ácido mevalónico) a partir de la HMG-CoA reductasa (HMGCR), una de las enzimas más reguladas en la naturaleza. La HMGCR es una proteína unida a la membrana del retículo endoplásmico (RE) cuyo dominio catalítico se encuentra orientado hacia la cara citosólica y es la enzima limitante de la velocidad de la VM (Acimovic et al. 2013). La mevalonato quinasa (MK) cataliza la fosforilación de mevalonato para dar fosfomevalonato. La MK es la segunda enzima esencial de la vía después de la HMGCR. Si bien no tiene la capacidad de modular la velocidad de la vía, se ha demostrado que puede ser regulada por mecanismos de retroalimentación (al igual que HMGCR), a partir de diferentes intermediarios de la VM (Hinson et al. 1997). En la siguiente reacción se produce una nueva fosforilación, en la cual la fosfomevalonato quinasa (PMK) convierte el fosfomevalonato en bifosfomevalonato (MPP), que posteriormente es decarboxilado por la MPP decarboxilasa para formar isopentenilpirofosfato (IPP), que constituye la unidad estructural cuya polimerización dará origen a los distintos productos poliisoprenoides de la vía. Una isomerasa cataliza la interconversión de IPP en su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), siendo ambos isoprenoides precursores de distintos productos celulares (Buhaescu et al. 2007; Gruenbacher et al. 2015). En la siguiente reacción se produce la condensación “cabeza-cola” entre IPP y DMAPP para generar una molécula de geranyl pirofosfato (GPP), el cual reacciona con otra molécula de IPP en una segunda reacción “cabeza-cola” para formar un intermediario de 15 carbonos clave de la VM: el farnesil pirofosfato (FPP). Ambas reacciones de condensación son catalizadas por la enzima FPP sintasa (Gruenbacher et al. 2015). Este punto representa la primera ramificación de la vía. Una rama continúa hacia la síntesis de colesterol en una serie de aproximadamente 20 reacciones. Una segunda rama produce moléculas no esteroideas esenciales para el funcionamiento celular

como ubiquinona y hemo-A, que participan en la respiración celular aeróbica, y dolicol, que interviene en la N-glicosilación de proteínas. Finalmente, una tercera rama deriva en la condensación de FPP e IPP para dar gernaingeranil pirofosfato (GGPP), en donde FPP y GGPP pueden ser utilizados como sustrato en la modificación postraduccional de proteínas de unión a membrana (prenilación de proteínas) (Jo et al. 2010). A continuación se presentan con mayor detalle cada una de las reacciones que participan en la síntesis de los diferentes productos de la vía a partir de FPP. Además se destaca la importancia biológica de dolicol y ubiquinona, dos de los productos de una de las ramificaciones de la vía, mientras que para colesterol y proteínas preniladas (productos de las otras dos ramificaciones) se tratarán en detalle en las secciones siguientes.

El dolicol es un alcohol isoprenoide ubicado en la membrana del RE cuya función es la de transportar oligosacáridos durante la N-glicosilación de proteínas. Su síntesis comienza a partir de trans-FPP o GGPP los cuales son elongados por adición sucesiva de residuos de IPP a partir de la acción de una cis-prenil transferasa, lo que resulta en una molécula hidrofóbica que combina insaturaciones de tipo cis/trans. Finalmente se producen dos defosforilaciones consecutivas y una reacción de reducción, lo que convierte a este lípido en un alcohol cuyo grupo α -isopreno es saturado. En mamíferos, el dolicol presenta un largo de cadena conteniendo entre 18-21 residuos de isopreno, siendo el dolicol con 19 residuos el más abundante en células humanas (Swiezewska et al. 2005; Jones et al. 2009).

La ubiquinona es un componente necesario de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Además, es el único antioxidante liposoluble sintetizado endógenamente, el cual previene eficientemente la oxidación de proteínas, lípidos y ADN (Bentinger et al. 2010). Adicionalmente a las ya mencionadas, en los últimos años se le han asignado un número creciente de funciones, entre las que se destacan la prevención de apoptosis (Papucci et al. 2003) y propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas (Thomas et al. 1996; Schmelzer et al. 2007). A diferencia de otros lípidos de la VM, la ubiquinona posee un anillo benzoato no isoprenoide (derivado de la tirosina), el cual está unido a una larga cadena isoprenoide que contiene entre 6 y 10 unidades de isopreno, dependiendo de la especie. Esta cadena es sintetizada por la enzima trans-preniltransferasa que cataliza la condensación de FPP con varias

moléculas de IPP, todas en la configuración trans (Tran et al. 2007). En la etapa siguiente, se produce la unión de la cadena con el 4-hidroxibenzoato (4-HB) por acción de la 4-HB transferasa, luego de lo cual se producen diferentes modificaciones sobre el anillo 4-HB para dar finalmente ubiquinona. Su velocidad de síntesis está dada por la disponibilidad de la cadena lateral isoprenoide en las células, ya que el 4-HB generalmente se encuentra en exceso (Bentinger et al. 2010).

En otra de las ramificaciones de la VM, tanto FPP como GGPP representan isoprenoides activados que pueden ser transferidos postraduccionalmente a diferentes clases de proteínas. Entre ellas, se destacan proteínas de la lámina nuclear, la subunidad γ de proteínas G heterotriméricas y de pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras (Rho, Rac, Rab, Rap, Ras) que cumplen un importante papel en muchas cascadas de señalización dentro de la célula (Konstantinopoulos et al. 2007). La prenilación aporta un dominio hidrofóbico que juega un rol preponderante en la unión de estas proteínas a la cara citosólica de las membranas celulares, requisito esencial para cumplir su función biológica. Las tres enzimas que pueden catalizar esta reacción son la farnesil transferasa (FTasa) y las geranilgeranil transferasas (GGTasa) I y II (Ahearn et al. 2012; Thurnher et al. 2013).

Por último, la primera etapa comprometida a la síntesis de colesterol se produce a partir de la combinación de dos moléculas de FPP para dar escualeno, en una reacción catalizada por la enzima escualeno sintasa (SS). A partir de allí la ruta biosintética continúa con una serie de intermediarios esteroideos (triterpenos) que presentan la estructura de 4 anillos fusionados denominada "colestano". El escualeno es convertido a lanosterol, el primer intermediario cíclico, en una serie de dos reacciones. En una primera instancia, el escualeno es convertido a 2,3-monoxidoescualeno (MOS) por acción de la enzima escualeno monoxigenasa/epoxidasa (SM). En la segunda reacción el MOS es transformado en lanosterol a partir de la enzima 2,3-oxidoesqualeno: lanosterol ciclasa (OSC) o simplemente lanosterol sintasa (LSS). La síntesis avanza con una serie de reacciones de demetilación, deshidrogenación e isomerización del lanosterol para dar finalmente colesterol. Este proceso se lleva a cabo a través de dos ramificaciones post-lanosterol de la vía que dan lugar a las denominadas vía de Bloch y vía de Kandutsch-Russell (Bloch 1952; Kandutsch et al. 1960). En la vía de Bloch, la reacción final es la

conversión de desmosterol a colesterol por la enzima esterol- Δ 24-reductasa (DHCR24), de modo que todos los intermediarios entre lanosterol y desmosterol contienen un doble enlace Δ 24. En la vía de Kandutsch-Russell, DHCR24 actúa sobre lanosterol y por ende todos los intermediarios desde 24,25-hidrolanosterol hasta 7-dehidrolanosterol contienen una cadena lateral saturada. Dado que la enzima DHCR24 puede en principio metabolizar cualquier intermediario de lanosterol en adelante, ambas vías no pueden ser tratadas de forma separada. Estudios de la especificidad de sustrato para DHCR24 realizados *in vitro* por Bae y colaboradores (Bae et al. 1997) manifestaron al 24-dehidrolathosterol como el sustrato más reactivo, lo que sugiere que la síntesis de colesterol comienza preferentemente por la vía de Bloch de lanosterol a 24-dehidrolathosterol y luego cambia a la vía de Kandutsch-Russell a nivel de lathosterol. De esta forma, el 7-dehidrocolesterol aparece como último intermediario principal antes de ser convertido a colesterol por la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (DHCR7) (Acimovic et al. 2013).

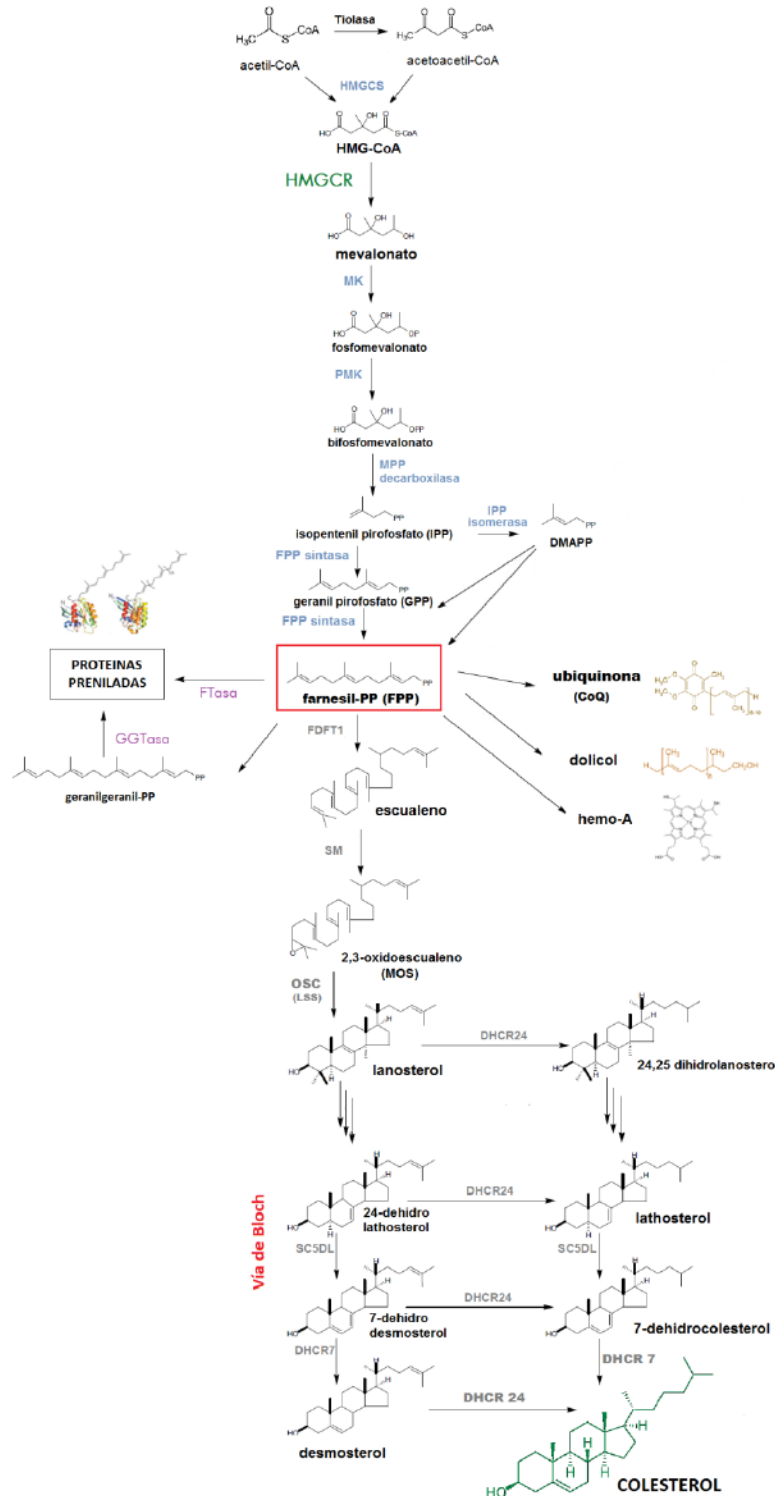


Figura 1.2. Vía del mevalonato. Esquema que representa los intermediarios y productos destacados de la VM y las enzimas que catalizan las reacciones comunes a todos los productos de la vía (celeste), las reacciones de prenilación (violeta) y aquellas específicas de la síntesis de colesterol (gris). Se destaca además la HMGCR (verde), enzima reguladora de la velocidad de la VM, y el principal punto de ramificación a nivel de farnesil-PP (recuadro rojo).

1.3. REGULACIÓN DE VÍA DEL MEVALONATO

Como se mencionó en la sección 1.1, el exceso de colesterol en humanos resulta en niveles elevados de morbilidad y mortalidad, principalmente a partir del desarrollo de aterosclerosis que finalmente puede producir ECV como infarto del miocardio o accidente cerebro vascular. Dado que el colesterol puede obtenerse tanto de la dieta como de la *síntesis de novo*, la necesidad de una inhibición por retroalimentación negativa de la vía de síntesis de colesterol es primordial (Burg et al. 2011). Schoenheimer y Breusch descubrieron este mecanismo en ratones al observar que los roedores producían colesterol en una proporción inversa a la cantidad presente en su dieta (Schoenheimer et al. 1933). Unos años más tarde Siperstein y Guest determinaron que el blanco de dicha regulación negativa mediada por colesterol era la HMGCR (Siperstein et al. 1960). De allí en adelante se ha demostrado que la HMGCR es regulada tanto a nivel transcripcional y traduccional, como a partir de modificaciones y degradación postraduccionales (Figura 1.3) (Goldstein et al. 1990; Goldstein et al. 2006). De las más de 20 enzimas que participan de la VM, la HMGCR es especialmente adecuada para ser el punto principal de regulación de la vía ya que cataliza una reacción irreversible al comienzo de la misma (Burg et al. 2011). La HMGCR fue purificada por primera vez por Michael Brown en 1973 (Brown et al. 1973) lo que permitió posteriormente, junto con el avance en el campo de la biología molecular, el clonado del gen de la reductasa y un detallado estudio de su regulación (DeBose-Boyd 2008). Básicamente, la HMGCR es una proteína integral de la membrana de RE de 888 aminoácidos que consta de dos dominios bien diferentes: una región hidrofóbica N-terminal que atraviesa múltiples veces la membrana y es clave en la regulación por retroalimentación y una región C-terminal que se extiende hacia el citoplasma y representa el dominio catalítico de la enzima (Burg et al. 2011).

Los factores de transcripción de unión a membrana denominados proteína de unión al elemento regulatorio de esteroides (sterol regulatory element-binding protein -SREBPs-) activan directamente la expresión de más de 30 genes dedicados a la síntesis y captación de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos (Horton et al. 2002; Goldstein et al. 2006; Raghoe et al. 2008).

Dos genes codifican para las tres isoformas de SREBP (~ 1150 aminoácidos): SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. Las dos primeras provienen del mismo gen y se diferencian en la longitud de su dominio activador N-terminal (Bengoechea-Alonso et al. 2007). Las tres isoformas difieren en su expresión en diversos tejidos y sus genes blanco (Raghow et al. 2008). SREBP-1a es un potente activador de todos los genes SREBP-sensibles, incluyendo aquellos que median en la síntesis de colesterol, ácidos grasos, y triacilglicéridos, en tanto las formas SREBP-2 y SREBP-1c predominan en el hígado y sus funciones son más restringidas (Horton et al. 2002). SREBP-1c induce principalmente la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ácidos grasos (ATP citrato liasa, acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa (FAS), esteroil-CoA desaturasa, y glicerol-3-fosfato aciltransferasa) pero no para la síntesis de colesterol. SREBP-2, por el contrario, activa preferentemente la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo del colesterol: todas las enzimas colesterogénicas desde acetil-CoA y el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLR, low density lipoprotein receptor) (Sakakura et al. 2001; Horton et al. 2002; Goldstein et al. 2006). Aun cuando cada isoforma de SREBP actúa sobre distintas vías biosintéticas, todas ellas son reguladas por los niveles de esteroides y por una proteína denominada Scap (SREBP cleavage-activating protein). Todas las isoformas de SREBP constan de 3 dominios: el N-terminal, de unión a ADN y que actúa como factor de transcripción maduro, el intermedio que proporciona el anclaje a membrana, y el C-terminal que cumple funciones regulatorias (Horton et al. 2002; Raghow et al. 2008). Una vez sintetizado, SREBP se inserta en la membrana del RE en donde su dominio C-terminal se une al dominio C-terminal de Scap. Cuando los niveles de colesterol son bajos, Scap dirige SREBP desde el RE al aparato de Golgi en vesículas revestidas con COPII, gracias al sitio de reconocimiento para COPII que presenta Scap. En Golgi residen dos proteasas específicas de unión a membrana: S1P y S2P, las cuales producen dos eventos proteolíticos secuenciales liberando la región N-terminal de SREBP, denominada SREBP nuclear (nSREBP). Ésta trasloca al núcleo donde activa la transcripción de diversos genes al unirse al elemento de respuesta a esteroides (SRE) presente en las secuencias promotoras. Como resultado se produce un aumento en la síntesis y captación de colesterol que finalmente inhibirá la activación de SREBP (Horton et al. 2002; Espenshade 2006; DeBose-Boyd 2008; Ikonen 2008).

Un avance importante en el entendimiento de las bases moleculares involucradas en la regulación por retroalimentación (*feedback*) de la HMGCR por esteroides fue el descubrimiento de una proteína de RE denominada Insig (Insulin induced gene). Esta proteína contiene 6 regiones transmembrana y regula la HMGCR tanto transcripcionalmente como postraduccionalmente (Goldstein et al. 2006; Burg et al. 2011). Cuando los niveles de colesterol son altos, éste se une fuertemente a Scap a partir de un dominio de 5 hélices transmembrana altamente conservado denominado dominio sensor de esteroides (SSD, sterol sensing domain) (Ikonen 2008). La unión del colesterol promueve un cambio conformacional que expone una región del dominio N-terminal de Scap capaz de interactuar con Insig, enmascarando su sitio de unión a COPII, lo que impide que Scap-SREBP sea cargado en las vesículas de transporte. De esta forma, el complejo Insig-Scap-SREBP permanece retenido en RE (Goldstein et al. 2006; Bengoechea-Alonso et al. 2007). Por otra parte, cuando los niveles de colesterol son elevados se producen derivados oxidados del mismo denominados oxisteroides, entre los cuales está el 25-hidroxicolesterol, que es capaz de unirse a Insig y facilitar la interacción con Scap (Ikonen 2008). Alternativamente, cuando los niveles de esteroides son bajos, Insig se disocia de Scap y el complejo SREBP-Scap es transportado al aparato de Golgi.

Además de modular la transcripción de la HMGCR a través de SREBP, Insig promueve su degradación proteosómica por ubiquitinación, la cual es estimulada por dos señales lipídicas: una mediada por un esteroide y la otra por un isoprenoide no esteroideo de 20 carbonos, el geranilgeraniol (GGOH). Así como Scap, HMGCR posee también un dominio SSD. En condiciones de alta disponibilidad de esteroides, Insig se une a la región N-terminal de HMGCR y recluta un complejo ubiquitin ligasa (gp78-Ubc7-VCP) que promueve la ubiquitinización de la reductasa y degradación en el proteosoma (Song et al. 2005b; Bengoechea-Alonso et al. 2007; Burg et al. 2011). Llamativamente el colesterol es un inductor muy leve de esta degradación y en cambio, el intermediario lanosterol y su metabolito 24,25-hidroxicolesterol, son inductores mucho más potentes. La actividad de ambos es específica ya que estos esteroides no son capaces de inhibir el procesamiento de SREBP (Song et al. 2005a; Goldstein et al. 2006; DeBose-Boyd 2008; Ikonen 2008). GGOH no es necesario para la ubiquitinización de HMGCR, sin embargo estimula su degradación por un mecanismo no dilucidado que podría involucrar proteínas

geranilgeraniladas que participan en el transporte vesicular, como las de la familia Rab (DeBose-Boyd 2008; Burg et al. 2011).

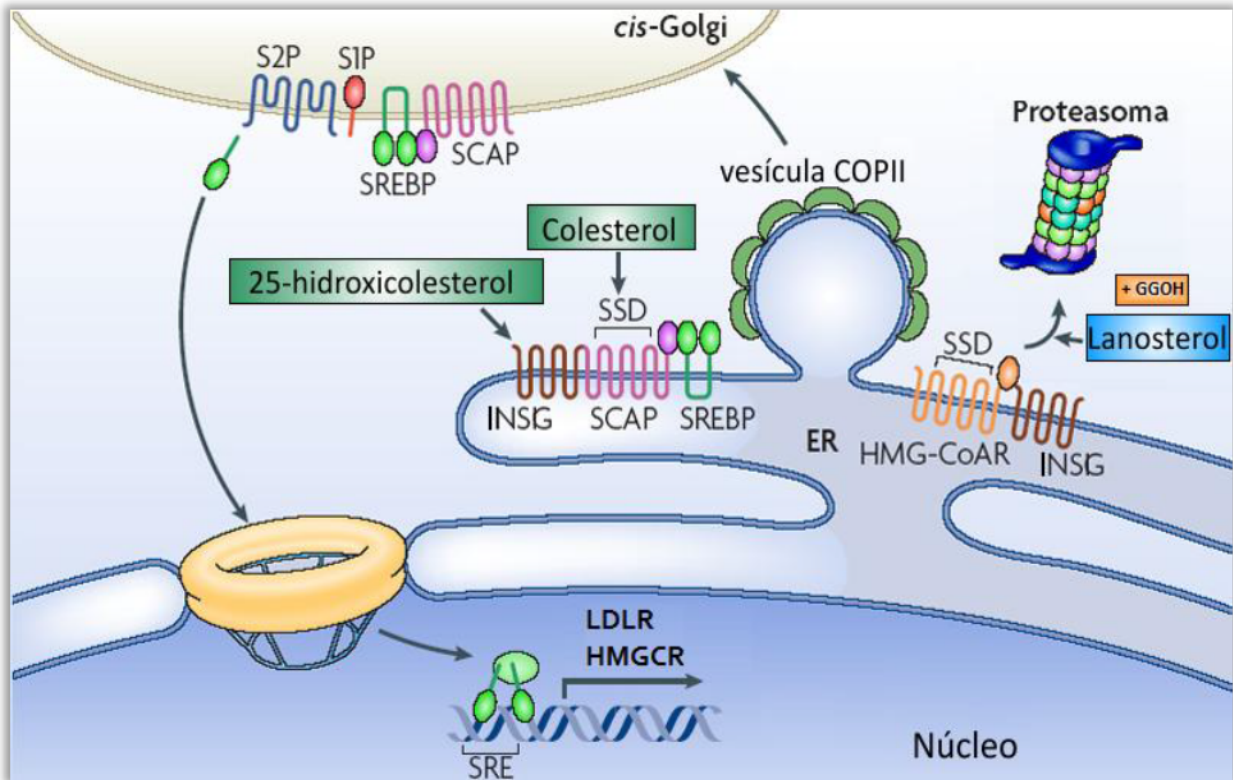


Figura 1.3. Regulación de la vía del mevalonato. SREBP controla la transcripción de la HMGCR y de LDLR. SREBP-Scap reside inactivo en la membrana del RE. Cuando el colesterol celular es escaso, lo cual es sentido a nivel del dominio sensor de esteroides (SSD) de SCAP, el complejo se transporta al aparato 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 de 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 niveles elevados de esteroides, la acumulación de lanosterol favorece que Insig se una a la región NH₂-terminal de la HMGCR y recluta enzimas que conjugan con ubiquitina a HMGCR. Este mecanismo se ve favorecido en presencia geranilgeraniol (GGOH) (Adaptado de Ikonen 2008).

La HMGCR también es regulada, dependiendo del estado metabólico de la célula, por un mecanismo independiente de Insig que se supone ayuda a optimizar la disponibilidad de ATP en condiciones de estrés celular (Engelking et al. 2005; Hardie et al. 2006). Cuando los niveles intracelulares de ATP son bajos, y por ende la relación AMP/ATP es alta, aumenta la actividad

catalítica de la enzima AMPK (AMP-activated protein kinase). En estas condiciones, la enzima fosforila HMGCR e inhibe su actividad por un mecanismo no del todo dilucidado. La defosforilación de la HMGCR, mediada principalmente por la proteína fosfatasa 2A, restablece completamente su actividad (Friesen et al. 2004).

Por último, la traducción de la HMGCR es regulada por un isoprenoide no esteroideo no identificado (Goldstein et al. 2006). La región 5' no traducida del gen de la reductasa podría participar en dicho proceso, sin embargo este tipo de regulación es por mucho el menos estudiado (Burg et al. 2011).

1.4. METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol fue descubierto en el año 1815 por el químico francés M.E. Chevreul como un componente de los cálculos biliares y originalmente lo llamo colesterina (*cole*= bilis, *stereos*= sólido). Su formula empírica ($C_{27}H_{46}O$) fue establecida recién hacia 1888 por F. Reinitzer, y su estructura correcta reportada por H. Wieland en 1932 (Vance et al. 2000). Está formado por cuatro anillos fusionados (A, B, C, D) con dos grupos metilos angulares en las posiciones C10 y C13, siendo estas características comunes a todos los esteroides naturales. El colesterol posee además un grupo 3β -OH en el anillo A, que lo convierte en una molécula anfipática, un doble enlace entre C5 y C6 y una cadena lateral isooctilo en C17 (Figura 1.4, panel A) (Chang et al. 2006; Cortes et al. 2013).

El colesterol es un constituyente de las membranas celulares que modula la fluidez y permeabilidad de las mismas. Actualmente se considera que la interacción del colesterol con los fosfolípidos de membrana es predominantemente de tipo biofísica (Figura 1.4, panel B) mientras que con las proteínas es de tipo estereoespecífica (Westover et al. 2004). Este lípido de membrana es necesario para la formación de caveolas y *lipid rafts* cumpliendo un rol importante en el tráfico vesicular, en procesos de señalización transmembrana y en la viabilidad y proliferación celular (Goedeke et al. 2012; van der Wulp et al. 2013). Su distribución en membranas a nivel subcelular es muy heterogénea. Su principal destino es la membrana plasmática (60-80%) mientras que en el RE solo se encuentra el 0,5-1% del colesterol total

(Cortes et al. 2013). Además, el colesterol es precursor de todas las hormonas esteroideas, vitamina D, oxisteroles y ácidos biliares que cumplen funciones fisiológicas importantes (Ikonen 2006; Goedeke et al. 2012).

A pesar de su importancia crítica, y como se viene señalando en reiteradas oportunidades, niveles anormales de colesterol pueden causar serias consecuencias a nivel celular, provocando enfermedades como aterosclerosis y diabetes tipo II. Por esta razón, las células han desarrollado mecanismos muy complejos de regulación en los niveles y distribución del colesterol celular (Ikonen 2006; Goedeke et al. 2012).

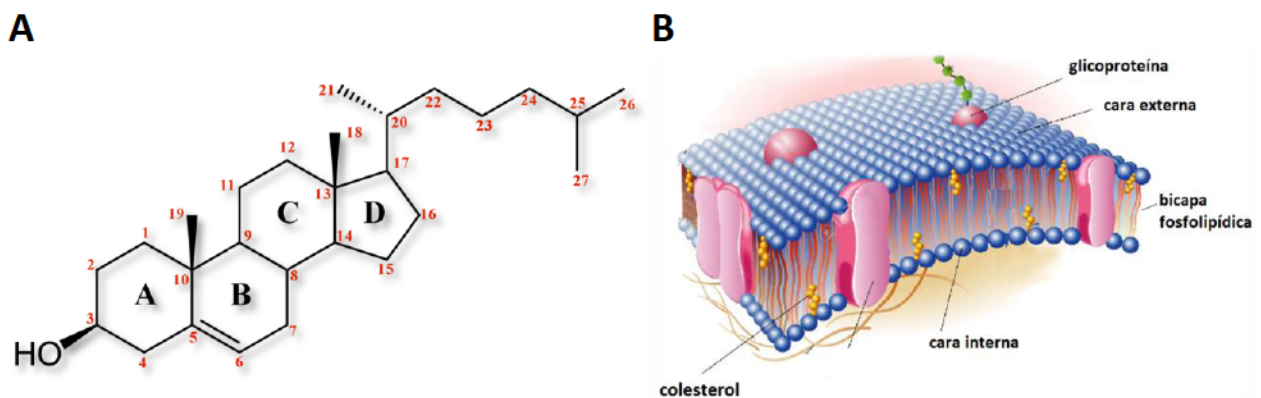


Figura 1.4. Estructura de la molécula de colesterol y su disposición en la membrana plasmática. (A) La estructura de colesterol consiste en cuatro anillos (A, B, C, D), con dos grupos metilo angulares situados en C10 y C13, un grupo 3 β -OH en el anillo A, un doble enlace entre C5 y C6 y una cadena lateral (isooctilo) en C17. (B) El colesterol se orienta con su hidroxilo 3-OH próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana, mientras que la porción apolar (anillos fusionados y cola alifática) se encuentra sumergida en la bicapa lipídica interaccionando con la primer porción de las cadenas alifáticas de los fosfolípidos.

Los seres humanos, y mamíferos en general, obtienen el colesterol a partir de la síntesis endógena y de la dieta en una relación aproximada de 70/30. En una dieta occidental típica, la biosíntesis a partir de acetil-CoA oscila entre 800-1000 mg/día, mientras que el colesterol proveniente de la ingesta ronda los 400-500 mg/día. Este último resulta del aporte de colesterol presente tanto en los alimentos ingeridos (300 mg/día) como del que se excreta en sales biliares (1 g/día), teniendo en cuenta que solo se absorbe un 40% del colesterol disponible a nivel

intestinal (Ros 2003; Ikonen 2006; van der Wulp et al. 2013). El hígado es el órgano central en el metabolismo del colesterol ya que no solo es el principal sitio de síntesis endógena (50% del total en el organismo), sino que además controla su secreción en sangre y eliminación (Zhao et al. 2010; Cortes et al. 2013). Esto lo hace a través de la producción de lipoproteínas y su captación mediada por receptores, de la formación de esteres de colesterol y su almacenamiento, y de su excreción del organismo a través de la bilis. El intestino también cumple un papel determinante regulando su absorción y excreción en las heces (Zhao et al. 2010; Fisher et al. 2012; Cortes et al. 2013).

Dado que el colesterol es una molécula muy hidrofóbica, su absorción intestinal requiere previa emulsificación, hidrólisis del colesterol esterificado (CE) de la dieta, solubilización micelar por sales biliares y posterior captación por parte de los enterocitos (van der Wulp et al. 2013). La incorporación de colesterol estaría facilitada por transportadores NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like1) localizados en el borde en cepillo de la membrana apical de los enterocitos del intestino delgado. Estos receptores colocalizan con dos transportadores de la familia ABC (ATP-binding cassette), ABCG5/G8, los cuales promueven la expulsión del colesterol libre (no esterificado) al lumen intestinal, regulando así los niveles de absorción del mismo (Ikonen 2006; Goedeke et al. 2012). El colesterol intracelular que no es expulsado por ABCG5/G8, es esterificado en RE por acción de la enzima acil-CoA: colesterol transferasa 2 (ACAT2). Una vez esterificado, el colesterol es empaquetado en quilomicrones (QM) junto con fosfolípidos y triacilglicéridos (TAG), su principal componente. De allí es enviado al sistema linfático para luego alcanzar el torrente sanguíneo (Ros 2003; Saavedra et al. 2012; van der Wulp et al. 2013).

Una vez en circulación, algunos de los TAG de los QM son hidrolizados por la lipoprotein lipasa (LPL) de los lechos capilares, generando los remanentes de QM (QMr). Los QMr son capturados por los hepatocitos, los cuales utilizan sus lípidos para producir las partículas de muy baja densidad (VLDL, very low density lipoprotein) (Goedeke et al. 2012; Saavedra et al. 2012).

Las VLDL son ricas en TAG y contienen entre 10-15% de colesterol. Son transportadas en sangre hacia los tejidos adiposo y muscular, donde la LPL se activa hidrolizando los TAG y libreando ácidos grasos que pueden ser utilizados como fuente energética principalmente en el músculo, o ser almacenados en adipocitos. De esta forma se convierten en partículas de LDL

(low density lipoprotein) ricas en colesterol y fosfolípidos. Las LDL son las principales lipoproteínas que distribuyen el colesterol en los tejidos periféricos y sus niveles en sangre están íntimamente relacionados a los acontecimientos pro-aterogénicos y al desarrollo de enfermedades coronarias (Ikonen 2006; Cortes et al. 2013). La captación de LDL a partir del LDLR, ubicado en la superficie celular, es un caso típico de endocitosis mediada por receptor. Una vez que la partícula de LDL se une al LDLR, el complejo formado es endocitado en vesículas recubiertas de clatrina y transportado a los compartimentos endocíticos ácidos donde el CE es hidrolizado por lipasas. El LDLR se disocia de la LDL en los endosomas tempranos y es devuelto a la membrana plasmática (MP) en un ciclo de reciclaje mediado por vesículas. El colesterol continúa por la vía endocítica hacia endosomas tardíos, lisosomas y luego es liberado a otras membranas como la MP, RE y mitocondria. Este transporte puede darse por mecanismos vesiculares mediados por GTPasas de la familia Rab, o no vesiculares, a partir de la acción de las proteínas NPC1 y NPC2 (Niemann-Pick C1 y C2) (Ikonen 2008; Goedeke et al. 2012).

Dado que las células no son capaces de degradar el colesterol, cuando los tejidos extra-hepáticos poseen un exceso del mismo, éste se transfiere a través de transportadores ABCA1/G1 hacia partículas de HDL (high density lipoprotein), las cuales son sintetizadas en el hígado. Las HDL cargadas de colesterol (HDL madura) son transportadas a tejidos esteroideogénicos, que utilizan el colesterol como precursor biosintético, o nuevamente al hígado, donde el colesterol es eliminado en un proceso que se conoce como transporte reverso de colesterol (TRC). De allí que los niveles de HDL correlacionan inversamente con la predisposición a desarrollar aterosclerosis. El colesterol de las HDL se internaliza al hígado mediante un receptor específico denominado SR-B1 (scavenger receptor class B type1). Desde los hepatocitos, el colesterol es secretado en la bilis, ya sea como colesterol libre (a partir de los transportadores ABCG5/G8) o modificado, en forma de ácidos biliares. Posteriormente, la bilis se vuelca al intestino delgado, desde donde el colesterol y sales biliares pueden ser re-absorbidos o eliminados en las heces (Goedeke et al. 2012; Saavedra et al. 2012; van der Wulp et al. 2013). En los últimos años se ha sugerido que la tradicional vía hepatobiliar no sería la única vía de eliminación del colesterol. Se ha demostrado en ratones, y se cree que también existe en humanos, una eliminación directa del colesterol en sangre hacia el intestino en un mecanismo denominado excreción del

colesterol transintestinal (TICE) (van der Velde et al. 2007; van der Velde et al. 2010). Actualmente se desconoce los mecanismos y actores que participan en este proceso (van der Wulp et al. 2013).

La figura 1.5 esquematiza de forma simplificada los mecanismos mencionados en esta sección para el transporte y metabolismo del colesterol.

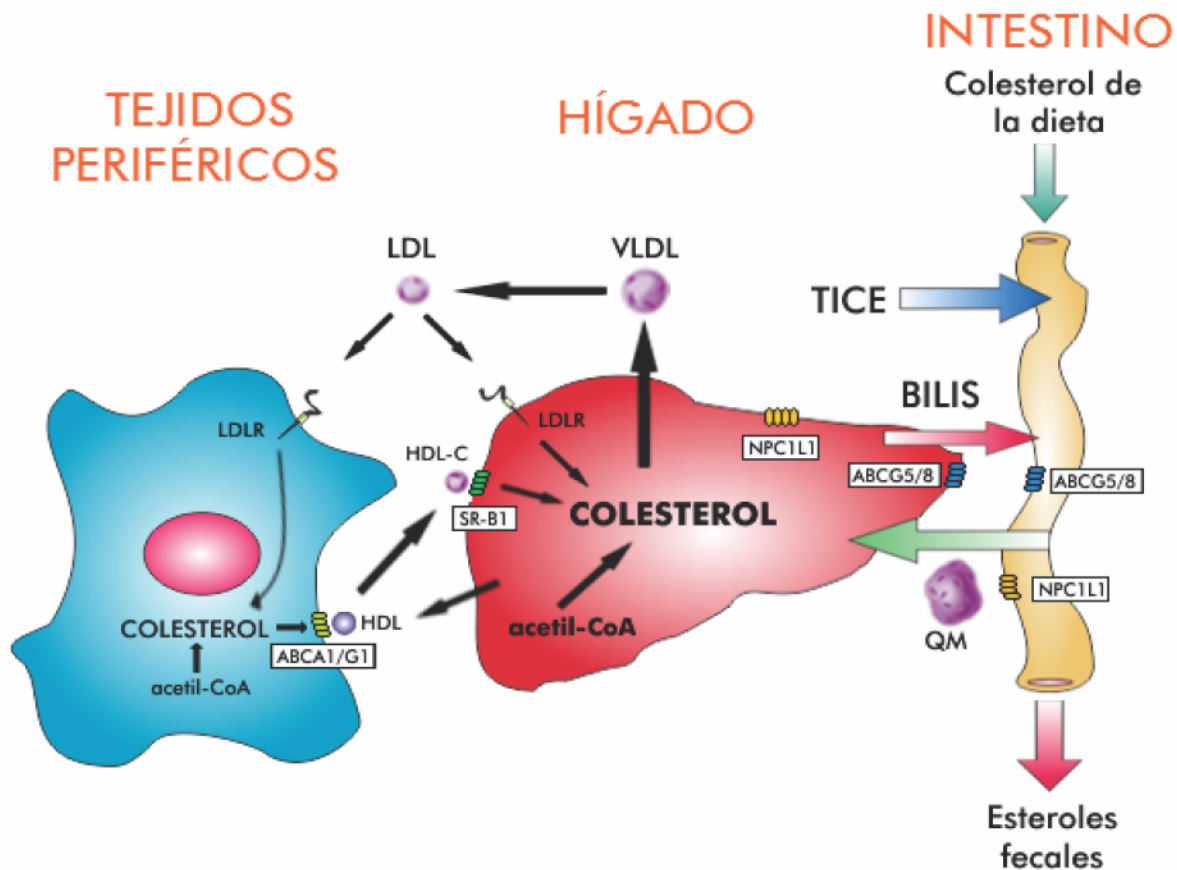


Figura 1.5. Transporte de colesterol. El colesterol y los triacilglicéridos (TAG) dietéticos son absorbidos por los enterocitos del intestino delgado para formar los quilomicrones (QM). Algunos de los TAG se hidrolizan en la circulación dando lugar a los remanentes de quilomicrones que son tomados por los hepatocitos. El hígado sintetiza VLDL que son metabolizadas en el torrente sanguíneo con la remoción de una extensa porción de TAG por los tejidos periféricos, convirtiéndose en partículas LDL. Las células de los mamíferos adquieren el colesterol exógeno principalmente a partir de las LDL, a través del LDLR. Cuando los tejidos extra hepáticos tienen exceso de colesterol, este se transfiere 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 libre o como ácidos biliares), la cual se vuelca en el intestino delgado. Además, el colesterol puede ser eliminado directamente desde el torrente sanguíneo a la luz intestinal por una vía alternativa a la hepatobiliar, en un mecanismo denominado excreción transintestinal del colesterol (TICE). A partir de ahí, colesterol y sales biliares se reabsorben (ciclo entero-hepático) o son excretados en las heces.

A partir de la regulación de los mecanismos de síntesis (mencionados en la sección 1.3) y de distribución y eliminación del colesterol aquí presentados, el organismo se adapta a sus necesidades y a la variabilidad de los niveles de colesterol obtenidos de la dieta. Cuando alguno de estos mecanismos falla o el individuo lleva a cabo una alimentación excesiva en grasas, se producen desbalances que conllevan a un exceso de colesterol en circulación sanguínea o de su eliminación por vía biliar. En el primer caso se ve favorecida la acumulación de CE en las paredes arteriales que promueve la formación de placas de ateroma (van der Wulp et al. 2013). En el segundo, la sobresaturación de colesterol en las sales biliares facilita su precipitación promoviendo la formación de cálculos biliares (Portincasa et al. 2006).

1.5. VÍA DEL MEVALONATO Y CÁNCER

El cáncer es una patología que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado. Se produce por la presencia continua de señales proliferativas, la evasión de mecanismos supresores del crecimiento, la disminución de apoptosis, la capacidad de inducir angiogénesis y la exacerbación del comportamiento migratorio de las células que le permite invadir tejidos adyacentes o provocar metástasis en tejidos no adyacentes (Hanahan et al. 2011). Dado que durante la proliferación es necesaria la duplicación de todos sus componentes en cada división celular, resulta claro que las células cancerosas requieren un metabolismo muy activo. Actualmente se reconoce que un metabolismo lipídico aberrante es una de las características clave en estas células. La lipogénesis *de novo* provee una amplia variedad de moléculas lipídicas que cumplen diferentes funciones de señalización, modificación postraducciona de proteínas y aporte energético para sostener la continua división celular y facilitar la metástasis (Santos et al. 2012; Zhang et al. 2012; Huang et al. 2015).

Diferentes líneas de evidencia proponen que la VM es capaz de favorecer el desarrollo y progresión del cáncer. Se han encontrado variedad de tumores que presentan una expresión y actividad aumentada de la HMGCR respecto de las células normales, o bien, que son deficientes en el control *feedback* de la transcripción de la reductasa aunque su regulación postraducciona se mantiene intacta (Larsson 1996; Duncan et al. 2004; Mo et al. 2004). Estudios epidemiológicos sobre pacientes que consumen regularmente estatinas mostraron un menor

riesgo de contraer ciertos tipos de cáncer (Kumar et al. 2008; Kwan et al. 2008). Por último, se ha visto que la forma mutante de p53 (que en condiciones normales es considerado un gen supresor de tumores), presente en más del 50% de los cánceres humanos, es capaz de estimular la actividad de la VM en las células cancerígenas. Esto favorece la prenilación de proteínas y por ende el mantenimiento del fenotipo maligno (Thurnher et al. 2013). El análisis de todos estos resultados sugiere que HMGCR tendría un rol clave en la transformación, desarrollo y/o mantenimiento de las células malignas y se la propone como un posible oncogén (Clendening et al. 2010). El hecho de que inhibidores de la VM reviertan el fenotipo maligno de ciertos tipos celulares refuerza la idea de que esta vía metabólica es un importante blanco terapéutico (Thurnher et al. 2012).

Como ya se ha mencionado, la hiperactividad de la VM facilita la prenilación de pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras, las cuales se asocian a la transformación y malignidad celular (Pisanti et al. 2014; Gruenbacher et al. 2015). Las GTPasas pequeñas son proteínas que hidrolizan GTP para dar GDP. Cuando unen GTP (forma activa), estas proteínas adoptan una conformación que les permite interactuar con moléculas efectoras y disparar la cascada de transducción de señales a la cual se acopla. Cuando la proteína está unida a GDP se presenta en su forma inactiva. Si bien estas GTPasas, como su nombre lo indica, poseen la capacidad de hidrolizar el GTP, el intercambio de GTP por GDP es muy lento, por lo que existen proteínas reguladoras que modulan la actividad de las GTPasas. Estas proteínas accesorias interactúan con las GTPasas ya sea potenciando su actividad hidrolítica (proteínas GEF) o bien favoreciendo el intercambio de GDP a GTP (proteínas GAP). Entre todas las GTPasas, las proteínas más estudiadas son de la superfamilia Ras. Ésta se compone de cinco familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (López Alcalá 2006; Konstantinopoulos et al. 2007). De todas ellas, Ras y Rho son las familias principalmente asociadas a distintos procesos biológicos pro-oncogénicos (Downward 2003; Konstantinopoulos et al. 2007; Santarpia et al. 2012; Wilson et al. 2013).

Las proteínas de la familia Ras (H-Ras, N-Ras y K-Ras A y K-Ras B) son GTPasas de 21 kDa que se ubican ancladas a la cara interna de la MP, y son importantes en la transducción de señales transmembrana (Ahearn et al. 2012; Bharate et al. 2012). Están codificadas por 3 genes diferentes, en donde K-Ras A y B son productos de un mismo gen obtenidos por *splicing*

alternativo (Bharate et al. 2012). En respuesta a diferentes estímulos extracelulares como la presencia de mitógenos, estas proteínas se activan (unen GTP) e interaccionan con más de 20 moléculas efectoras incluyendo las quinasas Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) y PI3K (phospahtidylinositol 3-kinase), modulando vías de señalización involucradas principalmente en la progresión del ciclo celular, supervivencia y diferenciación (Figura 1.6) (Schubbert et al. 2007; Pylayeva-Gupta et al. 2011). Las 4 isoformas de Ras presentan idéntico dominio catalítico y solo difieren en una porción de unos 20 aminoácidos de su extremo C-terminal (Figura 1.7) que determina su anclaje a diferentes microdominios de la membrana (Gysin et al. 2011; Ahearn et al. 2012). Las proteínas de la familia Rho (también de 21 KDa) se distribuyen en varios compartimentos membranosos subcelulares y son fundamentales en la reorganización del citoesqueleto. Además, ambas familias participan activamente en la expresión génica (Bar-Sagi et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2007).

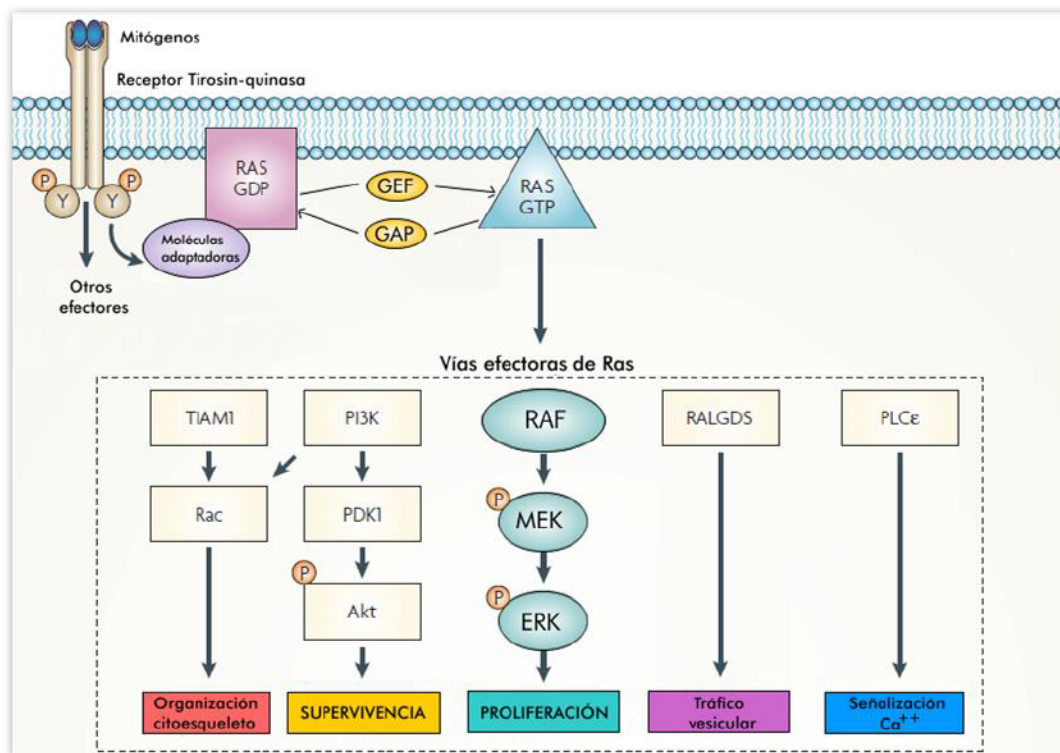


Figura 1.6. Vías de señalización de Ras. Receptores de tipo tirosin-quinasa se activan frente a un estímulo mitogénico y actúan sobre moléculas adaptadoras que interaccionan con Ras promoviendo su activación (Ras-GTP). En el esquema se simplifican las principales vías moduladas por Ras y las proteínas efectoras que habitualmente se ven afectadas por mutaciones en desórdenes del desarrollo y cáncer. Las vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt son las principales vías desreguladas en células tumorales (**Adaptado de Schubbert 2007**).



Figura 1.7. Dominio C-terminal de las proteínas Ras. En la figura se detallan las secuencias del dominio C-terminal para cada de las 4 proteínas Ras. Se destacan los sitios de unión de los residuos farnesilo y palmitoilo y la secuencia polibásica de lisinas característica de K-Ras B (Adaptado de Gysin 2011).

Inicialmente las GTPasas pequeñas son sintetizadas en el citosol, compartimento donde sufren su primer modificación postraducciona a partir de las enzimas preniltransferasas (FTasa y GGTasas I y II). La FTasa cataliza la adición del FPP a la proteína, proceso denominado farnesilación y las GGTasa I y II catalizan la adición de uno o dos residuos de GGPP, proceso denominado geranilgeranilación. La prenilación ocurre en una secuencia C-terminal CAAX (donde C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X puede ser cualquier aminoácido), en la cual el residuo C se conjuga con FPP o GGPP (Ahearn et al. 2012). Las proteínas de la familia Ras son preferentemente farnesiladas mientras que las de la familia Rho son geranilgeraniladas. De todos modos, es importante destacar que mientras H-Ras solamente es farnesilada, N-Ras y ambos tipos de K-Ras pueden ser también geranilgeraniladas en un proceso denominado prenilación cruzada (Konstantinopoulos et al. 2007). La prenilación dirige las proteínas al RE donde se produce la eliminación proteolítica del tripéptido AAX a cargo de la endopeptidasa RCE1 (Ras converting enzyme 1) y la carboximetilación en el residuo de cisteína isoprenilado por la enzima ICMT (isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase) (Gysin et al. 2011; Resh 2012).

Para el caso de las proteínas de la familia Ras, dado que la hidrofobicidad de un único residuo farnesilo no es suficiente, es necesaria una segunda señal para lograr un anclaje estable a la MP. Por ello H-Ras, N-Ras y K-Ras A son adicionalmente palmitoiladas en el aparato de Golgi y finalmente transferidas a la MP, a la cual se unen a través de sus grupo farnesilo o geranilgeranilo y palmitoilo (Salaun et al. 2010; Ahearn et al. 2012). Por otra parte, K-Ras B no requiere de palmitoilación (presenta un dominio de polibásico de lisinas que estabiliza su

anclaje por interacción con los grupos polares negativos que predominan en los fosfolípidos de la cara interna de la membrana) y por ende es transportada directamente del RE a la membrana (Schubbert et al. 2007; Resh 2012). A diferencia de la prenilación, la unión del residuo palmitoilo es reversible. Diferentes ciclos de palmitoilación/ depalmitoilación jugarían un papel adicional en la regulación de la localización de Ras entre la MP y Golgi, modulando su actividad espacio-temporal (Gysin et al. 2011; Resh 2012). La figura 1.8 esquematiza las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas Ras y permiten su anclaje a membrana.

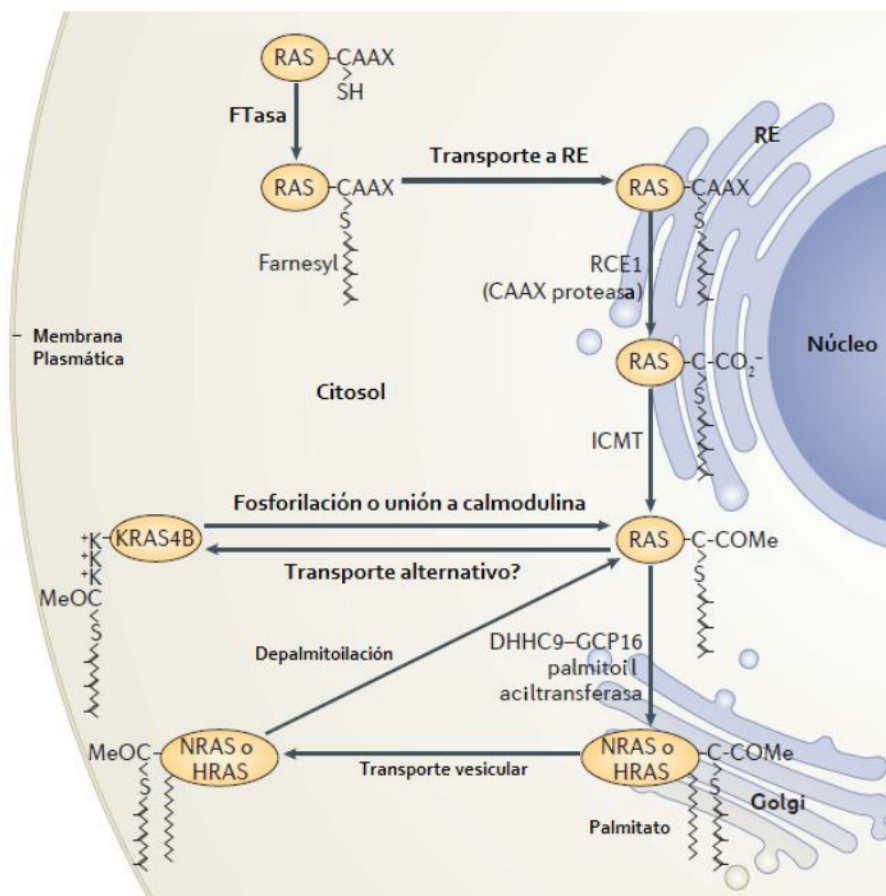


Figura 1.8. Modificaciones postraduccionales en proteínas de la familia Ras. Las proteínas de las familias Ras y Rho se isoprenilan en el residuo de cisteína dentro de la secuencia C-terminal CAAX en el citosol. El residuo isoprenilo facilita su localización en el retículo endoplásmico (RE) donde se lleva a cabo la eliminación proteolítica del tripéptido AAX a cargo de la endopeptidasa RCE1 y la carboximetilación en el residuo de cisteína isoprenilado por ICMT. Posteriormente las proteínas de cada familia continúan por caminos diferentes. Las proteínas de

la familia Ras son enviadas desde el RE directamente a la MP (K-Ras B) o luego de un paso previo por el aparato de Golgi donde se adiciona un segundo residuo hidrofóbico de palmitato en una cisteína adyacente al sitio de prenilación (N-Ras, H-Ras y K-Ras A) (Adaptado de Ahearn 2012).

La presencia de mutaciones de Ras en la célula está asociada con malignidad debido a que la estimulación anómala de las vías de señalización moduladas por ella contribuye a la oncogenicidad de esta proteína (Gysin et al. 2011; Pylayeva-Gupta et al. 2011). Se estima que

existen mutaciones activadoras de Ras en un 30% de los tumores humanos y dependiendo del tejido de origen, suele prevalecer alguna de las isoformas de Ras mutadas, siendo K-Ras la que aparece con mayor frecuencia (Chang et al. 2003; Schubbert et al. 2007; Cox et al. 2010). Las mutaciones más habituales, y que son suficientes para crear un fenotipo transformado de Ras, se dan en los codones 12, 13 y 61 (Cox et al. 2010). Estas mutaciones se encuentran en el 97-99% de los cánceres produciendo un fenotipo hiperactivado en el cual Ras es incapaz de hidrolizar la molécula de GTP (Walker et al. 2005; McTaggart 2006; Swanson et al. 2006; Cox et al. 2010; Gysin et al. 2011). En ausencia de mutaciones, la desregulación del estado activado de Ras también contribuye al desarrollo de cáncer (Oxford et al. 2003).

Ras en citoplasma es mitogénicamente inactiva y su prenilación, indispensable para su anclaje a membrana, es requerida para su actividad oncogénica (Kato et al. 1992; Walker et al. 2005; Swanson et al. 2006; Gysin et al. 2011). A diferencia de Ras, no se han reportado casos de mutaciones de Rho en tumores que promuevan su actividad constitutiva, aunque en la mayoría de los casos se observa una notable sobreexpresión de la misma (Sahai et al. 2002; Wilson et al. 2013).

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 la reorganización del citoesqueleto de actina, la adherencia célula-célula y la adherencia célula-sustrato. 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 (Etienne-Manneville et al. 2002; Sahai et al. 2002; Roberts et al. 2008; Wilson et al. 2013). Además, tanto Ras como Rho son capaces de estimular la angiogénesis (surgimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de los ya preexistentes), lo que favorece en gran medida el crecimiento tumoral (Bryan et al. 2007; Pylayeva-Gupta et al. 2011).

De este modo queda claramente establecida la relación entre la vía del mevalonato y la proliferación, migración, angiogénesis y supervivencia celular. Esto la convierte en un muy atractivo objeto de estudio para profundizar el conocimiento de los mecanismos participantes y para el descubrimiento y/o desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

1.6. ISOPRENOIDES NATURALES

Los isoprenoides naturales, también conocidos como terpenoides, son componentes no nutritivos de la dieta presentes en aceites esenciales de frutas cítricas y hierbas aromáticas. Estos más de 25.000 compuestos son derivados de la VM en plantas pero no son producidos por mamíferos y hongos (McGarvey et al. 1995; Chen et al. 2011). Todos ellos derivan de los precursores de 5 carbonos IPP y DMAPP, denominados unidades de isopreno (Rodríguez-Concepcion 2014). Los isoprenoides presentes en plantas se clasifican en 2 grupos principales: metabolitos primarios (hormonas, ubiquinona y compuestos relacionados a la fotosíntesis, entre otros) y metabolitos secundarios (hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y politerpenos)(Rodríguez-Concepcion 2014).

Los monoterpenos, como el geraniol, linalool, d-limoneno, 1,8-cineole y mentol, son isoprenoides de 10 carbonos formados a partir de la condensación de dos unidades de isopreno. Se ha descrito que algunos de ellos son capaces de disminuir el colesterol sérico (Chung et al. 2008; Galle et al. 2014) e inhibir el crecimiento de células tumorales tanto *in vitro* (Polo et al. 2006; Kim et al. 2012; Jia et al. 2013) como *in vivo* (Ong et al. 2006; Chaudhary et al. 2013; Galle et al. 2014), fenómeno que ha sido atribuido a los múltiples efectos farmacológicos de los isoprenoides sobre la VM: inhiben la actividad HMGCR a nivel postranscripcional (Peffley et al. 2003; Crespo et al. 2013; Jones et al. 2013), inhiben alguna enzima involucrada en la conversión de lanosterol en colesterol (Ren et al. 1994; Polo et al. 2006) e inhiben la isoprenilación de proteínas posiblemente a nivel de las prenil:proteín transferasas (Crowell et al. 1991; Mo et al. 2004; Afshordel et al. 2015). Numerosos trabajos realizados en modelos animales reportan la actividad antitumoral de distintos monoterpenos, como linalool, 1,8-cineole, geraniol y perilyl-alcohol, utilizando dosis para las cuales no se evidencia daño tisular en tejidos normales ni signos de toxicidad en general (Mills et al. 1995; Yuri et al. 2004; Cardozo et al. 2011; Murata et al. 2013; Jana et al. 2014).

La relación inversa entre el riesgo de cáncer y el consumo de frutas y vegetales ha sido bien documentada (Block et al. 1992; Kirsh et al. 2007; Kaefer et al. 2008; Aune et al. 2011). Si bien los niveles obtenidos a partir de la ingesta alimentaria de cada uno de los isoprenoides

probablemente no tienen suficiente impacto para ejercer un efecto protector contra el cáncer, esta protección puede ser atribuida a la acumulación de los efectos de los isoprenoides constituyentes sobre la actividad desregulada de la VM característica del tejido tumoral (Tatman et al. 2002). Como ya se ha mencionado, los isoprenoides poseen algunas de las características ideales para actuar como agentes cardioprotectores, quimiopreventivos y quimioterapéuticos: capacidad de inhibir síntesis de colesterol hepática, eficaz actividad antitumoral, disponibilidad comercial, bajo costo, biodisponibilidad oral y baja toxicidad.

1.6.1. Linalool

Linalool (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) es un monoterpeno alcohol lineal y uno de los componentes principales de las esencias florales de la naturaleza. Debido a la quiralidad del carbono hidroxilado, se presentan dos enantiómeros en plantas: (3S)-(+)-linalool (coriandrol) y (3R)-(-)-linalool (licareol) (Figura 1.9). Se encuentra presente en más de 200 especies de plantas, en particular aquellas de la familia Lamiaceae (lavanda, romero, albahaca), Lauraceae (canela, laurel), Theaceae (te verde, te negro) y Rutaceae (frutas cítricas) que producen (R)- o (S)-linalool en cantidades considerables.

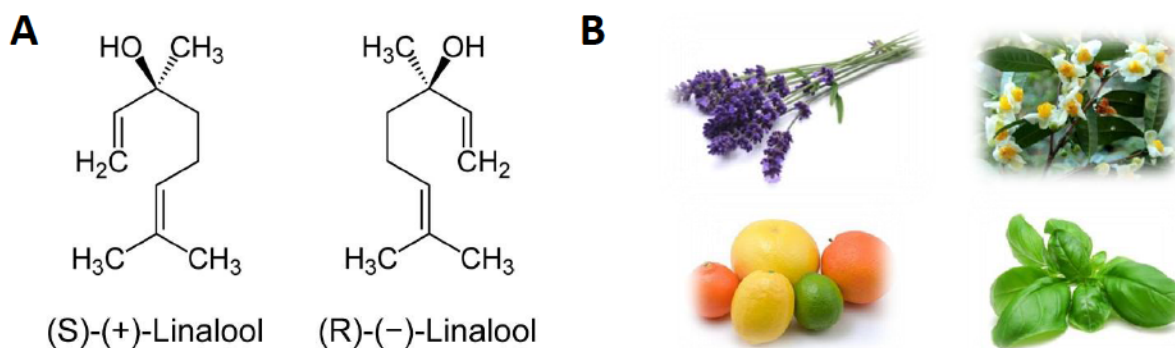


Figura 1.9. Linalool. (A) Estructura molecular de los enantiómeros (S)-(+)-linalool (coriandrol) y (3R)-(-)-linalool (licareol). (B) Imágenes representativas de albahaca, lavanda, esencias florales y frutas cítricas, en cuyos aceites esenciales el linalool está presente en considerable proporción.

Linalool es muy utilizado en la industria cosmética: está presente como componente principal en productos como perfumes, champús, desodorantes, cremas y detergentes. Además se lo utiliza como saborizante en comidas procesadas y bebidas. El consumo anual de linalool

supera los 1000 m³ (Cal et al. 2006; Lapczynski et al. 2008). Se han publicado variedad de trabajos mostrando la actividad biológica del linalool *in vivo* e *in vitro*, la mayoría de ellos reportando su actividad sedativa, ansiolítica, anticonvulsante, analgésica, anestésica local y antioxidante (Aprotosoai 2014).

1.6.2. 1,8-cineole

1,8-cineole (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano, cineole, eucaliptol, cajepitol) es un monoterpeno cíclico (Figura 1.10) presente en aceites esenciales de numerosas plantas como té, romero, salvia, laurel y eucalipto. Especialmente en el aceite esencial de eucalipto, el contenido de 1,8-cineole puede alcanzar hasta un 90% (Murata et al. 2013; Xu et al. 2014). Entre sus principales aplicaciones se destacan las preparaciones farmacéuticas para combatir los síntomas de la bronquitis, sinusitis, rinitis crónica, antitusivo y asma (Khan et al. 2014), en la industria cosmética, tratamiento del dolor muscular, neurosis y reumatismo (Duisken et al. 2005), como agente saborizante, estimulador percutáneo, aromaterapia (Guimaraes et al. 2013), insecticida y repelente de insectos (Sfara et al. 2009). Este monoterpeno ha sido objeto de innumerables estudios científicos, la mayoría de los cuales se concentran en sus propiedades antiinflamatorias, especialmente en enfermedades respiratorias, y su capacidad antioxidante (Santos et al. 2000; Silva et al. 2003; Khan et al. 2014).



1.7. ESTATINAS

Las estatinas fueron descubiertas en Japón en el año 1971 a partir de experimentos realizados por Endo y colaboradores con el especial propósito de encontrar metabolitos presentes en microorganismos que inhibieran específicamente la HMGCR (Endo et al. 1976a; Endo et al. 1976b). La primer estatina aislada fue la mevastatina (o compactina) proveniente del hongo *Penicillium citrinum*. En los años siguientes se dilucidó su mecanismo de acción y se demostró su capacidad de disminuir los niveles de LDL-C tanto en modelos animales como en humanos (Kuroda et al. 1979; Yamamoto et al. 1980). Actualmente existen 9 estatinas diferentes en el mercado, las cuales son de origen fúngico, semi-sintéticas o completamente sintéticas (Kaminsky et al. 2010; Sabri et al. 2010).

Estos compuestos son estructuralmente similares a la mevalonolactona (Figura 1.11), característica que les posibilita actuar como inhibidores competitivos de la HMGCR (Istvan et al. 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-C del plasma (Goldstein et al. 1990; Brown et al. 1997; Brown et al. 1999). Además se ha visto que incrementan los niveles de HDL, mejorando así los perfiles de colesterol sanguíneo y reduciendo la morbi-mortalidad cardiovascular en pacientes dislipidémicos (Gaw 2003; Wierzbicki et al. 2003).

La dosis recomendada en terapias hipocolesterolemiantes en humanos depende de la naturaleza de la estatina. Las mismas oscilan en un rango de 10 a 40 mg/día, con escasas excepciones (hasta 80 mg/día) (Keaney et al. 2014; Pastori et al. 2015). A pesar de ser bien toleradas, aun 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 (Hamelin et al. 1998; Rosenson 2004; Gazzero et al. 2012). A veces la miopatía toma la forma de rabdomiolisis con o sin insuficiencia renal aguda secundaria a la mioglobulinuria y, en raros casos, ha sobrevenido la muerte. El riesgo de miopatía aumenta por factores predisponentes (edad, sexo, tamaño corporal), con el aumento de

concentraciones plasmáticas de estatinas y con el uso de diversas drogas como inhibidores de citocromo P450 y otros fármacos reductores de lípidos (Rosenson 2004; Kaminsky et al. 2010).

Se cree que las estatinas hidrofílicas (Figura 1.11) son transportadas activamente en los hepatocitos a partir de la expresión de los transportadores de aniones orgánicos, mientras que las estatinas lipofílicas (Figura 1.11) pueden difundir de manera no selectiva en los tejidos extra-hepáticos como el músculo y causar los efectos adversos (Araki et al. 2012).

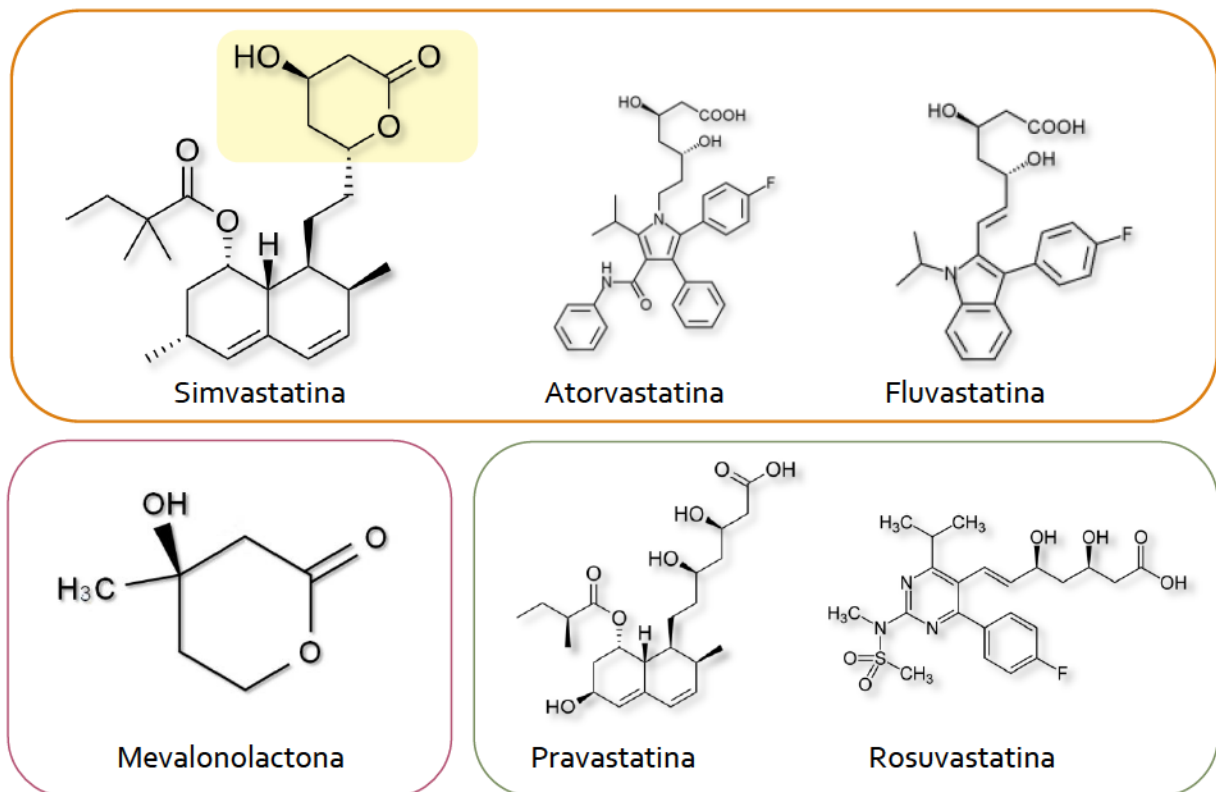


Figura 1.11. Estatinas. Estos son algunos ejemplos de las estructuras moleculares de las estatinas más utilizadas en el tratamiento de hipercolesterolemia. Se muestran simvastatina, atorvastatina y fluvastatina (liposolubles, en naranja), pravastatina y rosuvastatina (hidrosolubles, en verde). Su efectividad como agentes hipocolesterolemiantes se debe a su similitud estructural con la mevalonolactona (en violeta) que les permite inhibir competitivamente a la HMGCR.

En los últimos años se ha evaluado a las estatinas como potenciales agentes antitumorales, ya que, al inhibir la HMGCR, producen una depleción de los precursores isoprenoides de la VM que limita la isoprenilación de proteínas como Ras y Rho y por ende, reduce su actividad (Pisanti et al. 2014). De este modo, las estatinas afectan procesos críticos en

la génesis y progresión del cáncer como la movilidad y adhesión celular, reorganización del citoesqueleto, progresión del ciclo celular, angiogénesis y supervivencia entre otros (Bardou et al. 2010; Jakobisiak et al. 2010; Shimoyama 2011; Osmak 2012). La inhibición de la proliferación celular por estatinas se ha descrito en diversas líneas celulares. Cabe destacar que solamente las estatinas lipofílicas han mostrado efectividad antitumoral. Esto podría explicarse a partir de sus propiedades fisicoquímicas, ya que, a diferencia de las hidrofílicas, tienen la capacidad de atravesar fácilmente la membrana plasmática y acceder a su diana terapéutica (Kochuparambil et al. 2011; Araki et al. 2012; Osmak 2012; Islam et al. 2013; Pisanti et al. 2014).

Por otra parte, los resultados de su utilización *in vivo* en modelos animales son contradictorios. Se han observado diferencias dependiendo en parte de la dosis utilizada, de la vía de administración y de la velocidad de crecimiento del tumor (Polo et al. 2001; Wood et al. 2013). La capacidad de las estatinas de prevenir o estimular la incidencia de cáncer en pacientes tratados con estos fármacos también genera controversia (Poynter et al. 2005; Jacobs et al. 2006; Gonyeau et al. 2010; Vinogradova et al. 2011), por lo cual la utilización de las estatinas como drogas antitumorales es muy discutida (Osmak 2012; Pisanti et al. 2014).

1.7.1. Simvastatina

La simvastatina es una estatina lipofílica. Fue obtenida en el año 1991 por científicos de la compañía Merck y comercializada bajo el nombre de Zocor. Es un compuesto semi-sintético derivado de lovastatina, una estatina producto de fermentación del hongo *Aspergillus terreus* (Burns 2009; Kaminsky et al. 2010). A partir de la inhibición de HMGCR, la simvastatina es capaz de reducir en hasta un 40% los niveles del LDL plasmáticas. Se provee como una lactona inactiva (Figura 1.11) que requiere ser hidrolizada en el hígado para dar su forma activa (Burns 2009; Sabri et al. 2010).

Capítulo 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los isoprenoides inhiben a la HMG-CoA reductasa a través de mecanismos diferentes del empleado por las estatinas y adicionalmente afectan la vía del mevalonato a otros niveles.

Algunos monoterpenos pueden afectar la proliferación y el metabolismo de lípidos a través de diferentes mecanismos.

El uso combinado de isoprenoides naturales entre sí, o con estatinas permite incrementar la eficacia antitumoral de ambos compuestos y disminuir la dosis efectiva de las estatinas en el tratamiento de hipercolesterolemias hasta valores en los cuales los efectos indeseables sean prácticamente nulos.

OBJETIVOS GENERALES

Analizar la utilidad de isoprenoides abundantes en plantas locales en el tratamiento de hipercolesterolemia y prevención y tratamiento del cáncer, estudiando su eficiencia y mecanismos de acción.

Determinar si la administración conjunta de distintos isoprenoides presenta efectos beneficiosos.

Estudiar el potencial sinergismo de isoprenoides con estatinas como una alternativa para disminuir las dosis efectivas y la probabilidad de efectos indeseados y/o tóxicos de estas últimas.

Aportar conocimientos que resulten útiles en el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos naturales de amplia disponibilidad y bajo costo para la población.

Objetivos específicos

Utilizando células HepG2 (provenientes de un hepatocarcinoma humano) como modelo de célula hepática y células A549 (provenientes de un adenocarcinoma de pulmón humano) como modelo de células extrahepáticas, los objetivos específicos fueron:

1) Estudiar los efectos del **linalool y 1,8-cineole** sobre:

- la **proliferación celular**, analizando algunos de los mecanismos de acción implicados (alteraciones del ciclo celular, inducción de apoptosis y modificaciones en proteínas claves en la proliferación).
- el **metabolismo lipídico** en general, prestando particular atención a la síntesis de colesterol y de otros lípidos de la vía del mevalonato, analizando los posibles mecanismos involucrados.

2) Evaluar el **efecto combinado** de los monoterpenos **entre sí o con simvastatina** sobre los parámetros mencionados anteriormente (proliferación y metabolismo lipídico) analizando el posible efecto aditivo o sinérgico en la interacción entre ambos monoterpenos, o de cada uno de ellos con simvastatina.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DE ISOPRENOIDES Y ESTATINAS

Se seleccionaron dos monoterpenos representativos de frutas, vegetales y hierbas más frecuentes en nuestra zona. Los isoprenoides constituyentes fueron catalogados a través de búsquedas en Base de Datos de fitoquímicos y etnobotánica del Dr. Duke's. (<http://www.ars-grin.gov/duke/index.html>), y la base de datos FSTA (Food Science and Technology Abstracts®). Los monoterpenos seleccionados fueron linalool (LN) y 1,8- cineole (CN).

Se escogió simvastatina (SV) como estatina modelo debido a su amplia utilización en el tratamiento de la hipercolesterolemia y, dada su naturaleza hidrofóbica, a su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales.

3.2. MATERIALES

Los solventes orgánicos (calidad pro-analítica), las sales inorgánicas y el reactivo Folin-Ciocalteu fueron adquiridos a Carlo Erba Reagents (Milán, Italia).

Los estándares lipídicos, albúmina sérica bovina (ASB), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazolio (MTT), ioduro de propidio (IP); mevalonolactona 97%, (-)-linalool >95% y 1,8-cineole 99% se obtuvieron de Sigma–Aldrich (St.Louis, Estados Unidos); colorante rojo neutro y azul tripán de Anedra (Buenos Aires, Argentina) y estreptomycin de Richet (Buenos Aires, Argentina).

La simvastatina fue proporcionada gentilmente por Merck, Sharp y Dohme (Buenos Aires, Argentina). La sal sódica de simvastatina fue preparada disolviendo la droga en etanol a 60°C, agregando cantidades equimolares de NaOH y luego incubando a 60°C durante 1 hora. El etanol fue finalmente evaporado bajo corriente de N₂ y la sal sódica de simvastatina disuelta en agua destilada a concentración final de 5 mM (Sebti et al. 1991).

El medio esencial mínimo (MEM) y la tripsina fueron provistos por Gibco (Invitrogen Corporation) mientras que el suero fetal bovino (SFB) se adquirió a Natocor (Córdoba, Argentina).

Las sustancias radiactivas empleadas fueron [1,2-³H(N)]- colesterol (48,30 Ci/mmol) y [1-¹⁴C]-ácido acético (sal sódica, 56,50 mCi/mmol), ambas provistas por Perkin Elmer Life Sciences Inc. (Boston, Estados Unidos). Para la determinación de radiactividad por centelleo líquido se utilizó 2,5-difeniloxazol como fluorescente primario y 1,4-bis-(5-t-butilbezooxazol-2-il)-tiofeno como centellador secundario, ambas de Packard Instrument Company (Illinois, Estados Unidos).

En la separación de lípidos se utilizaron placas de sílica-gel G 60 de 20x20cm x 0.25mm adquiridas a Merck (Darmstadt, Alemania).

3.3. CULTIVO CELULAR

3.3.1. Línea celular HepG2

Esta línea celular de crecimiento adherente (Figura 3.1) fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células HepG2 derivan del tejido hepático de un varón caucásico de 15 años que presentaba un carcinoma hepatocelular (HCC) bien diferenciado. Estas células presentan morfología epitelial y contienen un número modal de 55 cromosomas. Conservan gran parte de las características bioquímicas de las células del parénquima hepático (Knowles et al. 1980; Schwartz et al. 1981). Secretan amplia variedad de proteínas plasmáticas como albumina, transferrina y proteínas de fase aguda como fibrinógeno y alfa-1-antitripsina. Son uno de los modelos *in vitro* por excelencia para el estudio de hepatocitos humanos polarizados y, dado que presentan un alto grado de diferenciación morfológica y funcional, constituyen un buen modelo para el estudio del tráfico intracelular y de lípidos. La actividad de la HMGCR de estas células puede ser regulada a diferentes niveles (Vock et al. 2008; Crespo et al. 2013) y responden al tratamiento con estatinas disminuyendo la síntesis de colesterol (Funatsu et al. 2001; Scharnagl et al. 2001), al igual que las células hepáticas normales. Los mecanismos de regulación *feedback* de la HMGCR por esteroides, que operan tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, están conservados en estas células tumorales (Mullen et al. 2010; Wang et al. 2012). Se caracterizan por mantener la mayoría de las actividades de metabolización de xenobióticos y se han reportado como un sistema útil y confiable para predecir tanto el metabolismo, como el efecto citoprotectivo o la citotoxicidad de diferentes

químicos y fármacos en el hígado humano (Javitt 1990; Rueff et al. 1996) así como también son ampliamente utilizadas como modelo de HCC (Notas et al. 2006; Li et al. 2009a; Nguyen et al. 2013).

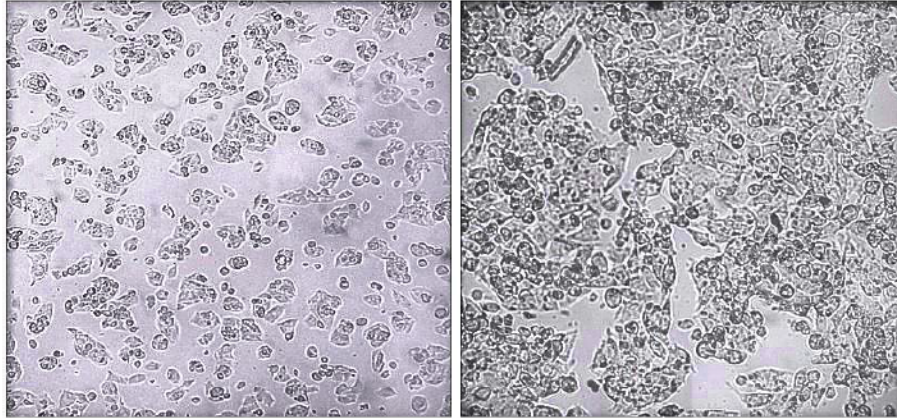


Figura 3.1. Morfología típica de células HepG2 observadas al microscopio óptico en condiciones normales de cultivo. (Izq.) Células HepG2 adheridas a baja confluencia (10X). (Der.) Células a mayor porcentaje de confluencia (40X).

3.3.2. Línea celular A549

La línea celular A549 (Figura 3.2) fue gentilmente donada por la Dra. Amada Segal-Eiras (CINIBA, UNLP, Argentina). Estas células provienen de un adenocarcinoma bronco-alveolar de pulmón humano. Fueron obtenidas por D.J. Giard y col en 1972 a partir de la remoción y cultivo de tejido pulmonar canceroso de un hombre caucásico de 58 años (Giard et al. 1973). Naturalmente son escamosas, presentan morfología epitelial y son responsables de la difusión de ciertas sustancias como agua y electrolitos a través de los alvéolos. Son capaces de sintetizar lecitina y poseen un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados, importantes en el mantenimiento de la membrana celular. Es una línea celular hipotriploide con un número modal de 66 cromosomas, de manipulación práctica y rápido crecimiento, ampliamente utilizada como modelo de célula tumoral pulmonar no pequeña (Chou et al. 2003; Hsu et al. 2004; Zhang et al. 2014). Se ha demostrado que presenta una actividad HMGCR mayor a células normales y que la misma está sujeta a una regulación *feedback* multivalente (Bennis et al. 1993). Presentan las características típicas de células del epitelio alveolar tipo II, que son de los pocos tipos celulares

en el pulmón en el cual se encuentran las enzimas de la familia citocromo P450. Están relacionadas con el metabolismo oxidativo de drogas en el pulmón y además, por presentar una detallada caracterización de sus propiedades endocíticas, esta línea celular resulta un modelo muy utilizado para el estudio del metabolismo y direccionamiento de drogas (Foster et al. 1998).

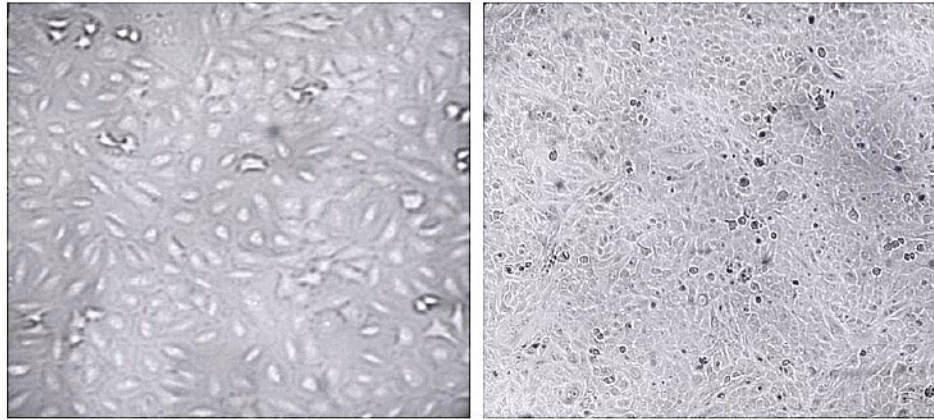


Figura 3.2. Células A549 observadas al microscopio óptico en condiciones de cultivo estándar. (Izq.) Células A549 adheridas a baja confluencia (40X). (Der.) Células confluentes en monocapa (10X).

3.3.3. Condiciones de cultivo celular

Los cultivos de mantenimiento de ambas líneas celulares se realizaron en botellas plásticas de cultivo de 25 ó 75 cm² con MEM esterilizado por filtración y suplementado con 10% SFB (v/v) y 0,1 mg/l de estreptomina. Las células se incubaron en estufa de cultivo gaseada con 5% (v/v) CO₂/aire a 37°C. El medio fue reemplazado cada 3-4 días hasta que las células alcanzaron aproximadamente un 90% de confluencia, momento en que se procedió a subcultivarlas. Para ello se descartó el medio, se lavó 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄] y se separaron de la superficie incubándolas con tripsina-EDTA [0,25%, 1 mM EDTA] durante 5-10 minutos en estufa a 37°C. La actividad de la tripsina se detuvo por adición de medio suplementado con 10% SFB y a partir de la suspensión celular resultante se realizó la siembra en placas y/o botellas dependiendo del uso posterior que tendrían.

3.3.4. Tratamiento de las células

Linalool, 1,8-cineole y simvastatina fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) previo a su adición al medio de cultivo, asegurándose que la concentración final de este vehículo en los controles y en los tratamientos no supere el 0,2% (v/v).

En función de los distintos ensayos a realizarse, las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (MTT), 24 pocillos (MTT y RN), 6 pocillos (recuento celular, TUNEL, incorporación de ^{14}C -acetato y de ^3H -colesterol, exportación de ^3H -colesterol y ciclo celular), botellas de 25 cm^2 (Western blot), placas de Petri de 100 mm de diámetro (Western blot, fraccionamiento subcelular y actividad de caspasa-3) o botellas de 75 cm^2 (composición lipídica).

Debido a que estas líneas celulares presentan diferentes tasas de proliferación, fue necesario ajustar la densidad de la siembra inicial de células para lograr un crecimiento exponencial al momento de comenzar los tratamientos, asegurando al mismo tiempo que no alcanzaran un 100% confluencia al finalizar los mismos (apéndice I).

En los ensayos realizados durante este trabajo, salvo que se indique lo contrario, los cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento se incubaron con medio fresco suplementado con 10% SFB y LN, CN o SV (individualmente o combinados) a las concentraciones pertinentes durante 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por medio sin suero suplementado con los diferentes compuestos y las células se trataron durante otras 24 horas.

3.4. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

3.4.1. Ensayo de MTT

La viabilidad celular se evaluó por el ensayo de MTT, un método colorimétrico analítico-cuantitativo que se basa en la conversión del MTT, de color amarillento, en una sal insoluble de formazán, un compuesto azul-violáceo oscuro con un máximo de absorbancia cercano a 560 nm. La reacción se produce a partir de la actividad de enzimas mitocondriales, principalmente la succinato deshidrogenasa, capaces de reducir el MTT, el cual acepta los electrones de algún

agente reductor o de coenzimas como NADH y NADPH produciendo cristales de formazán que posteriormente son solubilizados. La solución obtenida es cuantificada colorimétricamente (Mosmann 1983). Dado que esta reacción solo puede llevarse a cabo en células viables, la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células viables. Las células se incubaron con una solución de MTT (0,5 mg/ml en PBS) durante las últimas 2-3 horas de tratamiento. Las sales de formazán producidas se disolvieron en HCl 0,04 M en isopropanol y la absorbancia se determinó a 560 nm en lector de placas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector).

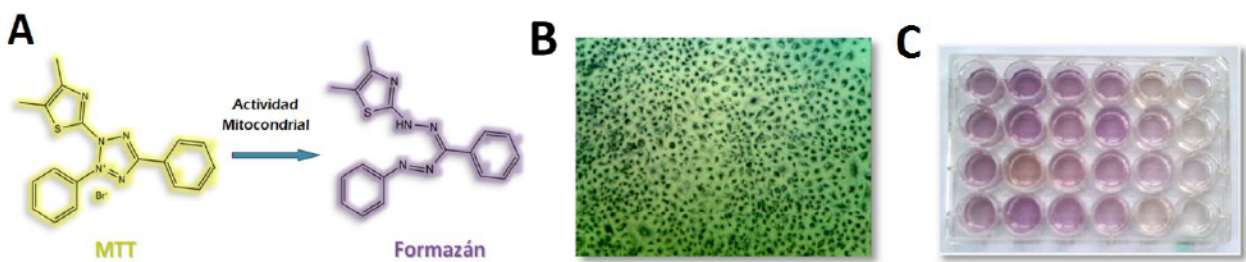


Figura 3.3. Transformación del MTT en formazán. Esta reacción se lleva a cabo a partir de la actividad de las enzimas mitocondriales en células viables. (A) Reacción catalizada por las enzimas mitocondriales. (B) Imagen de células A549 al microscopio óptico (10X) conteniendo el formazán insoluble. (C) El colorante es liberado con una solución ácida de isopropanol y la absorbancia leída a 560 nm.

3.4.2. Ensayo de Rojo Neutro

Este es otro método ampliamente utilizado para evaluar la viabilidad celular. Se fundamenta en la capacidad de las células viables, con su MP y compartimento endosomal funcionales, de captar el colorante rojo neutro (RN) por transporte activo y almacenarlo en lisosomas. Este colorante presenta preferencia por ambiente ácidos, fundamentalmente por el endosoma. El RN queda atrapado en los compartimentos endosomal y lisosomal debido a que se protona y, dada su carga positiva, es incapaz de atravesar las membranas, por lo que permanece retenido. Luego de permitir la incorporación del RN durante un tiempo, se libera el colorante de las células con una solución ácida-etanólica y cuantifica midiendo la absorción a 540 nm de la solución coloreada resultante (Borenfreund et al. 1985). Las células se trataron de la igual manera que para los ensayos de MTT y 3 horas antes de finalizar el tratamiento, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco conteniendo colorante RN (0,05 mg/ml). Se

lavaron las células con PBS y el colorante se liberó mediante solución de extracción (50% etanol en solución acuosa de ácido acético al 2%). La absorbancia de las suspensiones coloreadas se midió a 540 nm en lector de placas Beckman Coulter DTX 880.

3.4.3. Recuento celular

Las células fueron tripsinizadas durante 5-10 minutos y la reacción detenida por agregado de medio de cultivo fresco suplementado con 10% SFB. De la suspensión celular obtenida se realizó el recuento total de células en cámara de Neubauer (hemocitómetro, figura 3.4), un portaobjetos especializado donde una retícula es grabada con laser y para el cual la superficie y profundidad del mismo son conocidas, de modo que permite cuantificar número de células por unidad de volumen. Para visualizar las células muertas, la suspensión se mezcló generalmente en proporciones 1:1 con una solución 0,4% (p/v) del colorante azul tripán (azul diamina, azul niágara, azul vital), un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas. Luego de 1-2 minutos, la mezcla se colocó en la cámara y se realizó el recuento de células totales observadas al microscopio óptico, tanto las que incorporaron el colorante como las que no, procurando que el número de células por cuadrante de 4x4 no supere las 50 unidades. En caso contrario, se procedió a realizar una mezcla de proporciones 1:2 o 1:3 hasta lograr dicho propósito.

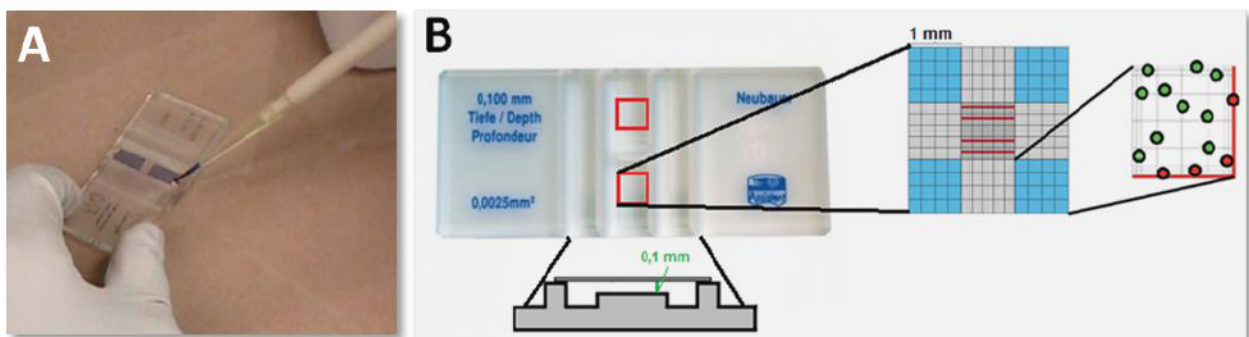


Figura 3.4. Metodología utilizada para recuento celular. La mezcla de la suspensión celular y solución de azul tripán se coloca la cámara de Neubauer (A). Luego de 1-2 minutos se observa al microscopio y se cuenta el número de células totales presentes en cada cuadrante (en celeste) de los 8 cuadrantes que posee el hemocitómetro (B), y se calcula el promedio de los mismos.

3.5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El ciclo celular se estudió por incorporación de IP en las células. El IP se incorpora de manera proporcional a la cantidad de ADN presente en la célula, la cual depende de la fase del ciclo en la que se encuentre (G0/G1, S o G2/M). La cantidad de IP presente en cada célula individual puede ser cuantificada por citometría de flujo, permitiendo determinar la proporción de células de una población que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular.

Para ello, las células tripsinizadas recolectadas en tubos plásticos de 15 ml se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos a 4°C, se lavaron con PBS, se centrifugaron nuevamente y el pellet celular se resuspendió en PBS frío para lograr una suspensión de 10⁶ células/ml. Las células se fijaron por agregado gota a gota de etanol 70° frío (9 partes de etanol por cada parte de suspensión celular) con agitación moderada en vórtex para evitar la formación de agregados, y luego se incubaron por al menos 4 horas a 4°C. La suspensión de células fijadas se almacenó a -20°C. Para el análisis, se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 3 ml de PBS y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (T°A) para su rehidratación. Después de una nueva centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 500 µl de una solución de IP/RNAsa [IP 25 µg/ml, RNAsa 100 U/ml, Triton X-100 0,1% (v/v) en PBS] y se incubó durante al menos 30 minutos a T°A en oscuridad. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD Biosciences, Estados Unidos) y los resultados fueron procesados con el software Flow Jo 7.6.2 (Tree Star, Oregon, Estados Unidos) (Figura 3.5).

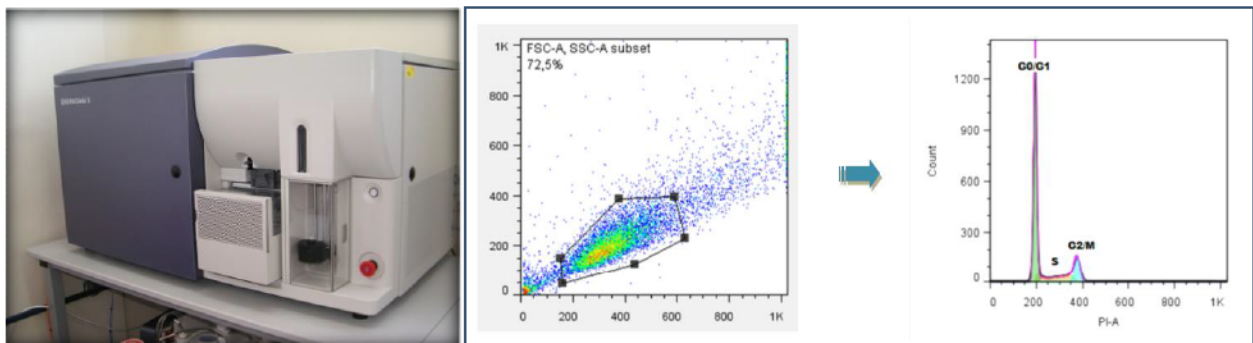


Figura 3.5. Análisis del ciclo celular. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria II y los resultados se procesaron con el software Flow Jo 7.6.2.

3.6. EVALUACIÓN DE APOPTOSIS

3.6.1. Actividad de Caspasa-3

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

Se cosecharon las células por tripsinización, se tomó una alícuota para recuento y el resto se centrifugó a 600 xg durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue lavado con PBS y centrifugado nuevamente. Se descartó el sobrenadante y se agregó el buffer de lisis provisto por el kit (10 µl por cada 10⁶ células). Se incubó 20 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 20.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y fue analizado inmediatamente o almacenado a -70°C.

Se colocaron 5 µl de cada muestra en tres pocillos de una placa de 96 pocillos y a uno de ellos se le adiciono 10 µl de inhibidor de caspasas para cuantificar proteólisis inespecífica de la actividad de caspasa-3. En forma paralela se agregaron (por duplicado) 5 µl de caspasa-3 200 µM (control positivo, aportado por el kit), con y sin inhibidor. Se llevó a todas las muestras a volumen final de 90 µl con buffer de reacción 1X (provisto por el kit) y se adicionó un blanco de reacción conteniendo solo 90 µl buffer de reacción. La reacción comenzó por agregado de 10 µl de sustrato a todos los pocillos y se incubó toda la noche a 37°C. La densidad óptica a 405 nm se determinó en el lector de placas mencionado anteriormente.

3.6.2. Ensayo de TUNEL

Este método permite identificar apoptosis celular a partir de la característica fragmentación del ADN producida como consecuencia de este proceso de muerte celular programada. La aparición de un gran número de pequeños fragmentos de ADN con extremos 3'-OH libres, por acción de endonucleasas activadas durante la apoptosis, permite la adición de desoxinucleótidos tri-fosfato (dUTP) marcados con el fluorocromo rodamina a dichos extremos

3'-OH a partir de la acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Así, es factible evaluar por microscopia de fluorescencia los núcleos de las células apoptóticas (Gorczyca et al. 1993).

Se lavaron las células 2 veces con PBS y se fijaron con 1,5 ml de una solución de paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 1 hora a T°A. Luego de 3 lavados con 2 ml de PBS durante 10 minutos, se agregaron 1,5 ml de solución de permeabilización [Triton X-100 0,1% (v/v) y citrato de sodio 0,1% (p/v) en PBS], se colocó a 4°C durante 2 minutos y se lavó nuevamente 3 veces con PBS. Como control positivo de la reacción se incubó una de las muestras control ya fijadas con DNAsa (Fermentas) durante 30 minutos a 37°C, se detuvo la reacción por adición de solución de EDTA 0,5 M y se lavó con PBS. Finalmente se incubaron todas las muestras 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®) según las instrucciones del vendedor. Al terminar la reacción, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS y se montaron en 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. Para la cuantificación, se tomaron aleatoriamente imágenes (a un aumento de 400 X) de diez campos para cada tratamiento y se analizaron con el software Image Pro Plus (IPPTM) v5.1 image analysis software (Media Cynernetics, Silver Spring, MA). La proporción de células apoptóticas se determinó calculando el número de núcleos apoptóticos (TUNEL positivos) respecto de los núcleos totales (teñidos con DAPI).

3.7. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

3.7.1. Separación de lípidos neutros

Los lípidos totales (LT) presentes en las células se extrajeron por el método de Folch (Folch et al. 1957). Para ello, se eliminó el medio de las botellas, se lavaron las células con PBS y se obtuvo una suspensión celular en PBS por raspado con espátula de silicona. Se separó una

alícuota para determinación de proteínas, el resto de la suspensión se centrifugó a 500 xg durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y al pellet celular se le agregó 5 ml de la mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v), se agitó vigorosamente en vórtex y se colocó a 4°C hasta el día siguiente. Finalmente se adicionó 1 ml de H₂O bidestilada, se mezcló enérgicamente y se aguardó a la separación de las fases acuosa (metanólica) y orgánica (clorofórmica). Se descartó la fase acuosa y la fase orgánica se filtró a través de papel Whatman en presencia de Na₂SO₄ anhidro (retiene posibles contaminaciones de naturaleza acuosa), se evaporó a seco bajo corriente de N₂ y los LT se resuspendieron en cloroformo. Los lípidos neutros (NL) se separaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica-gel G 60, previamente activadas durante 45 minutos a 120 °C. Se utilizó una fase móvil compuesta de una mezcla de éter de petróleo, éter etílico y ácido acético en proporciones 80:20:1 (v/v/v) (Christie 1982). Los lípidos se separaron en función de su polaridad, los más polares son afines a la fase estacionaria (agua retenida en la placa de sílica) y los menos polares son afines a la fase móvil. De esta forma, los lípidos polares como los fosfolípidos (FL) permanecieron en el punto de siembra mientras que los NL como colesterol libre (CL), triacilglicéridos (TAG) y colesterol esterificado (CE) se separaron en función de su mayor o menor afinidad por la fase móvil. Finalizada la cromatografía, las placas se expusieron a una atmósfera de vapores de yodo en una cuba que contenía yodo bisublimado, el cual forma complejos inespecíficos color ocre con compuestos orgánicos de manera reversible, lo que permite la localización de las distintas especies lipídicas que pueden ser reconocidas a partir de la ubicación relativa que ocupan en la placa de TLC. (Figura 3.6).

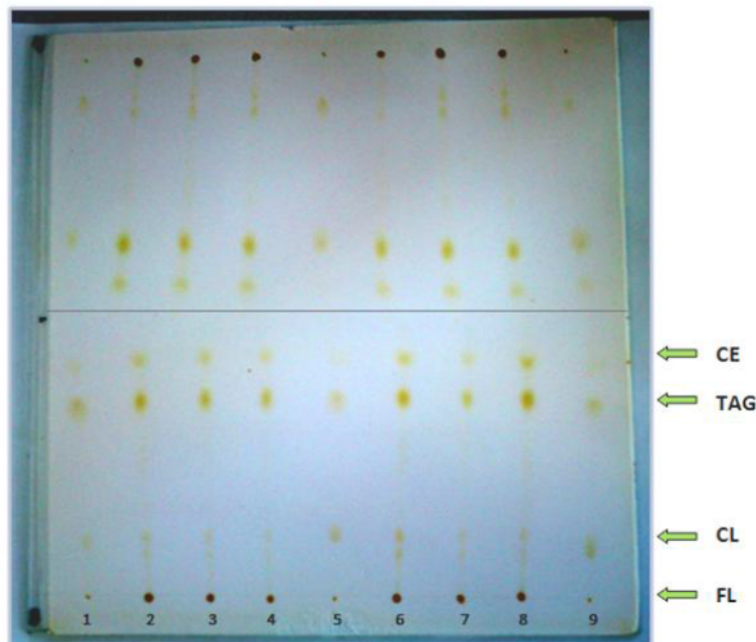


Figura 3.6. Localización de especies lipídicas coloreadas con yodo. Finalizada la separación de los lípidos neutros, la placa de TLC es colocada en una cuba de vidrio saturada en yodo durante unos minutos hasta la aparición de las manchas correspondientes a cada especie, permitiendo determinar su localización relativa a partir de una mezcla de estándares (calles 1,5 y 9). FL: fosfolípidos, CL: colesterol libre, TAG: triacilglicéridos, CE: colesterol esterificado.

3.7.2. Cuantificación de lípidos neutros y fosfolípidos

Los niveles de CL, CE, TAG y FL se cuantificaron a partir de los diferentes métodos detallados a continuación. El contenido de los diferentes lípidos se normalizó en función de la proteína celular total (PCT) correspondiente.

3.7.2.1. Triacilglicéridos

Las zonas correspondientes a TAG se rasparon de la sílica, se extrajeron los lípidos con cloroformo y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos para precipitar la sílica. La fracción clorofórmica se trasvasó a tubos de vidrio con tapa esmerilada y se evaporó el solvente a seco bajo corriente de N₂. Los TAG se determinaron colorimétricamente a 505 nm utilizando *kit* enzimático TG color (Wiener Lab, Rosario, Argentina) y se cuantificaron a partir de una curva de calibración realizada con estándares de trimiristina (10-100 µg) sembrada y resuelta en la misma TLC que las muestras problema.

3.7.2.2. Fosfolípidos

Las regiones correspondientes a FL se rasparon de la placa y se cuantificó el contenido de fósforo inorgánico (Pi) por el método de Chen (Chen et al. 1956). Para ello, la sílica raspada se colocó en tubos de vidrio y se mineralizaron las muestras por tratamiento con HClO_4 70% a 120°C durante toda la noche, lo que produjo la liberación de Pi. Luego de la mineralización, se adicionaron soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (0,44% p/v) en H_2SO_4 al 2,8% (v/v) y ácido ascórbico al 10% (p/v) en partes iguales y se incubaron a 45°C durante 20 minutos. Esta reacción genera la formación de un complejo entre el Pi y MoO_4 color verde-azulado, que fue determinado colorimétricamente a 820 nm. Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibración a partir alícuotas de una solución estándar de KH_2PO_4 1 mM y sometidas a los mismos procedimientos que los mencionados para las muestras.

3.7.2.3. Colesterol libre y esterificado

Luego del raspado de las zonas correspondientes a TAG y FL, se reveló el CL y CE aplicando una solución de $\text{FeCl}_3\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ en forma de espray sobre la placa y posterior carbonización a 180°C durante 10-15 minutos (Jung 1973). La cantidad de CL y CE se calculó utilizando curvas de calibración construidas a partir de mezclas de estándares de CL (4-10 μg) y CE (colesteril-palmitato, 2-6 μg) resueltas en la misma TLC.

3.8. INCORPORACIÓN DE ^{14}C -ACETATO EN LÍPIDOS TOTALES, LÍPIDOS INSAPONIFICABLES Y ÁCIDOS GRASOS

Durante las últimas 3 horas de tratamiento se agregó al medio sin suero ^{14}C -acetato (2 $\mu\text{Ci/ml}$). Luego se descartó el medio, se lavaron las células 3 veces con PBS y se extrajeron LT con hexano: isopropanol (3:2 v/v) durante 30 minutos en agitación moderada. El pellet celular remanente se disolvió en NaOH 0,1 M para la determinación de PCT (Scharnagl et al. 2001). La fracción orgánica conteniendo los LT se transvasaron a tubos de vidrio con tapa esmerilada, se evaporó completamente el solvente bajo corriente de N_2 y se resuspendieron los LT en 1 ml de cloroformo. Se tomó una alícuota de 10 μl para determinación de la incorporación de marca radiactiva en lípidos totales y alícuotas para las posteriores separaciones y determinaciones.

3.8.1. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos insaponificables y ácidos grasos

Tomando alícuotas de LT en cloroformo, se evaporó a seco el solvente en corriente de N_2 , se adicionó KOH en metanol (10% v/v) y se colocaron a 80°C durante 45 minutos para saponificar los lípidos. Los lípidos insaponificables (LI) se extrajeron de la fase alcohólica con hexano. Posteriormente, se acidificó la fase metanólica con HCl concentrado y se extrajeron los ácidos grasos con hexano.

La radiactividad incorporada en LT, LI y ácidos grasos se determinó por centelleo líquido en un contador a Wallac 1214 Rack Beta (Pharmacia, Turku, Finlandia).

Las distintas especies lipídicas presentes en la fracción insaponificable se separaron por TLC en placas de sílica-gel G 60 (activadas previamente a 120°C durante 45 minutos) utilizando cloroformo 100% como solvente de corrida. La cromatografía se desarrolló hasta que el frente de la fase móvil alcanzó 1 cm por debajo del borde superior de la placa.

La incorporación de radiactividad en las distintas especies del insaponificable se detectó por autorradiografía, exponiendo las placas sobre una pantalla Storage Phosphor Screen, GE Healthcare. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el software Image J y las clases lipídicas presentes se identificaron por comparación con una mezcla de estándares (colesterol, lanosterol, ubiquinona, dolicol y escualeno) desarrollada en la misma TLC. En todos los casos, los resultados se normalizaron con los respectivos niveles de PCT para cada muestra.

3.8.2. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos neutros y polares

Tomando alícuotas de LT en cloroformo, se evaporó a seco el solvente en corriente de N_2 , se resuspendieron los lípidos en cloroformo y se sembraron en placas de TLC previamente activadas. Las muestras sembradas en las placas se sometieron a dos corridas cromatográficas secuenciales utilizando distintos sistemas de solventes como fase móvil. En una primera instancia se resolvieron los fosfolípidos colocando la placa de TLC en una cuba saturada con un sistema de solventes compuesto por cloroformo, metanol, ácido acético y agua en proporciones 50:37,5:3,5:2 (v/v/v/v) (Crespo et al. 2013). La cromatografía se detuvo cuando el frente de corrida, en el cual se encuentran los NL, alcanzó la mitad de la placa (25-30 minutos). Las placas

se retiraron de la cuba y se colocaron en atmósfera de N_2 hasta la completa evaporación de los solventes remanentes. Posteriormente se realizó una segunda cromatografía que permitió la separación de los lípidos neutros utilizando una mezcla de éter de petróleo, éter etílico y ácido acético en proporciones 80:20:1 (v/v/v) como fase móvil. La corrida se prolongó hasta que el frente de la misma alcanzó 1 cm por debajo del límite de la placa.

Luego de retirar las placas de TLC de la cuba y permitir la evaporación de los solventes de la misma, la incorporación de radiactividad en las distintas especies de FL y NL se cuantificó por análisis densitométrico de las bandas detectadas por autorradiografía según se describe en el ítem anterior. Las clases lipídicas presentes se identificaron por comparación con una mezcla de estándares separados en las mismas condiciones. Se utilizaron estándares de los FL fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS) y difosfatidilglicerol (DFG, cardiolipina); y de los NL diacilglicéridos (DAG), CL, ácidos grasos libres (AGL), CE y trimiristina. En todos los casos, los resultados se normalizaron con los respectivos niveles de PCT para cada muestra.

3.9. INCORPORACIÓN Y EXPORTACIÓN DE 3H -COLESTEROL

3.9.1. Incorporación de 3H -colesterol

La determinación de la incorporación de colesterol exógeno se realizó según lo establecido por Polo y colaboradores (Polo et al. 2006) con mínimas modificaciones. Las células se trataron como se describió en la sección 3.3.4 y durante la última hora de tratamiento se adicionó al medio 3H -colesterol (1 μCi / ml de MEM). Se extrajeron lípidos totales con hexano: isopropanol (3:2 v/v) durante 30 minutos en agitación moderada y el pellet celular se disolvió en NaOH 0,1 M para la determinación de PCT. La fase orgánica se trasvasó a viales plásticos donde el solvente fue evaporado a seco bajo corriente de N_2 y los lípidos resuspendidos en 2,5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad presente fue determinada en el contador Wallac 1214 Rack Beta.

3.9.2. Exportación de ^3H -colesterol

La exportación de colesterol marcado radiactivamente se determinó según lo hecho por Polo y colaboradores (Polo et al. 2003). Luego de 24 horas de sembradas las células, se reemplazó el medio de cultivo por MEM sin SFB conteniendo ^3H -colesterol ($1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ de MEM) y se incubaron en condiciones estándar durante otras 24 horas. Un lote de células se separó para cuantificar el ^3H -colesterol que en promedio incorporaron las células por pocillo (“control de carga”). De ese lote se extrajeron los lípidos totales y se determinó la marca radiactiva incorporada de igual forma que para la sección anterior. Los demás lotes se trataron durante 48 horas en presencia de los distintos compuestos, luego de lo cual los lípidos fueron extraídos y la marca radiactiva presente en las células fue cuantificada. El porcentaje de exportación de colesterol se calculó por diferencia entre la radiactividad presente en las células “control de carga” y la remanente luego de los tratamientos.

3.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.10.1. Cuantificación de proteínas totales

3.10.1.1. Método de Lowry (Lowry et al. 1951)

Se tomaron alícuotas de $50 \mu\text{l}$ de muestra, se agregaron $650 \mu\text{l}$ de una solución de Na_2CO_3 2% en NaOH 0,1 M, tartrato de Na y K 2% en H_2O y CuSO_4 1% en H_2O (100:1:1, v/v/v) y se incubó a $T^\circ\text{A}$ durante 15 minutos en agitación leve para que se genere el complejo entre el Cu (II) y los enlaces peptídicos en medio alcalino. Posteriormente se adicionaron $50 \mu\text{l}$ de una solución de reactivo Folin-Ciocalteu en H_2O bidestilada (1:1 v/v), se agitaron vigorosamente las muestras y se mantuvieron durante 30 minutos en agitación leve a $T^\circ\text{A}$. En esta etapa se produce la reducción del reactivo de Folin por acción del complejo cupro-proteico generando un color azul oscuro. La DO a 750 nm se determinó en un espectrofotómetro GBC UV-Visible Cintra 10/20/40 (Sydney, Australia) y se cuantificó la concentración proteica utilizando una curva patrón de ASB como estándar.

3.10.1.2. Método de Bradford (Bradford 1976)

Este método fue adaptado a micro-método en placas de 96 pocillos. Se colocó una alícuota de 5 μl de muestra en cada pocillo y se agregaron 250 μl de reactivo Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 [0,01% (p/v) en etanol 4,70% (p/v) y H_3PO_4 8,50% (p/v)]. La unión del cromóforo CBB G-250 a proteínas promueve un corrimiento de su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm generándose un complejo color azul que es determinado espectrofotométricamente en lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a 595 nm luego de 2-5 minutos y antes de los 30 minutos. El complejo es formado rápidamente y posee un coeficiente de extinción tal que le aporta gran sensibilidad al método aunque su dispersión en solución es estable solo por 1 hora. La cuantificación de proteínas se obtuvo a partir una curva patrón realizada con soluciones estándar de ASB (0,2 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sometidas al mismo procedimiento que las muestras.

3.10.2. Procesamiento de las muestras para su posterior separación por electroforesis desnaturalizante y cuantificación de proteínas específicas por Western blot

3.10.2.1. HMGCR

Las células se cosecharon con 5 ml de PBS por raspado de la placa con espátula de silicona y se trasvasaron a tubos plásticos de 15 ml. La suspensión se agitó vigorosamente, se tomó una alícuota de 100 μl para determinación de PCT y el resto se centrifugó a 500 xg durante 10 minutos. El pellet celular se resuspendió en 500 μl de buffer de lisis 1 [Tris-HCl 120 mM- pH=6.8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v)], se incubó a 100°C durante 5 minutos y luego se rompió la cromatina nuclear pasando 15 veces las muestras a través de una jeringa con aguja de 26 Ga. El homogenato celular obtenido se almacenó en ultrafreezer a -70°C hasta su posterior uso.

3.10.2.2. Caspasa-3

Se lavaron las células 2 veces con 5 ml de PBS, se agregaron 500 μ l de buffer de lisis 2 [Tris-HCl 50 mM – pH= 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH= 8.0, Nonidet-P-40 1% (v/v)] conteniendo inhibidores de proteasas (Cóctel, MPBio, Nº Cat: 158837) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Se recolectó el homogenato celular resultante por raspado con espátula de silicona y se centrifugó a 15.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó y almacenó a -70°C hasta su uso.

3.10.2.3. Ras

Con el objetivo de obtener las fracciones citosólica y de membrana de las células, se realizó un fraccionamiento celular de acuerdo al protocolo de Palozza y colaboradores (Palozza et al. 2010) con mínimas modificaciones. Se lavaron las células 2 veces con 5 ml de PBS y se agregó 700 μ l de buffer de lisis 3 [Tris –HCl 10 mM -pH=7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, TritonX-100 0,5% y cóctel de inhibidores de proteasas], se incubaron durante 15 minutos a 4°C y se colectaron las células por raspado con espátula de silicona en tubos de plástico pre-enfriados. La suspensión obtenida en cada tubo, proveniente de 4 placas de Petri, se homogenizó a partir de 15 pasajes a través de una jeringa con aguja de 25 Ga. Del homogenato resultante se obtuvo una alícuota para futuras determinaciones y el resto fue centrifugado a 800 xg a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante posnuclear se transfirió a tubos de poli alómero de 5 ml y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman Optima LE-80K con un rotor SW60Ti a 32.000 xg a 4°C durante 1 hora. El sobrenadante, que corresponde a la fracción citosólica, se recuperó y almacenó a -70°C. El pellet obtenido, que representa la fracción de membrana, se resuspendió en 150 μ l de buffer de resuspensión [Tris-HCl 10 mM –pH=7.4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, TritonX-100 1% (v/v), SDS 0,1% (v/v)] conteniendo inhibidores de proteasas y se almacenó a -70°C hasta su ulterior utilización.

3.10.3. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Muestras con buffer de carga [Tris-HCl 0,5 M-pH=6.8, SDS 10% (p/v), β -mercaptoetanol 1% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v) y glicerol 15% (v/v)] se incubaron a 100°C durante 5

minutos para desnaturalizar completamente las proteínas. Las muestras de homogenato (20-60 μg proteína), de fracción citosólica (20 μg proteína) y de membrana (80-100 μg proteína) se sembraron en geles de poliacrilamida al 12,5% de 10 calles y se separaron durante 2 horas a 110 V en buffer de corrida [Tris 0,025 M – pH=8.3, Glicina 0,2 M y SDS 3,5 mM] en una celda de electroforesis Mini Protean II (BioRad, Estados Unidos).

3.10.4. Western blot

Las proteínas, separadas por electroforesis desnaturalizante, se transfirieron desde los geles a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Amersham-GE) utilizando buffer de transferencia [Tris 0,05 M, Glicina 0,04 M, Metanol 0,2% (p/v)] en un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot SD de Bio-Rad. La transferencia se realizó a 10 V durante 40 minutos. Al finalizar, la membranas se incubaron hasta el día siguiente a 4°C con leche descremada al 5% en buffer PBST [NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10,0 mM; KH₂PO₄ 2,0 mM; Tween-20 0,05 M; pH=7.4] para bloquear los sitios de unión no específicos en la membrana.

Las membranas se incubaron con cada anticuerpo primario durante 1 hora a T°A con agitación suave. Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con PBST y se incubaron durante 1 hora a T°A en agitación leve con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa (HRP). Tanto los anticuerpos primarios como secundarios fueron preparados en leche descremada al 2% en PBST a las respectivas diluciones (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Lista de anticuerpos empleados y sus diluciones				
Anticuerpo	Origen	Código	Dilución	Proveedor
Anti-HMGCR	Conejo	sc-33827	1:200	Santa Cruz
Anti-Caspasa 3	Ratón	sc-271028	1:500	Santa Cruz
Anti-Pan-Ras	Ratón	OP-40	1:500	Calbiochem
Anti- β actina	Ratón	AC-15	1:10.000	Sigma Aldrich
Anti-Conejo (HRP)	Cabra	sc-2004	1:3000	Santa Cruz
Anti-Ratón (HRP)	Cabra	ab-6789	1:2000	Abcam

Terminada la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBST y se reveló la actividad peroxidasa de las bandas inmunoreactivas utilizando los reactivos de luminol y ácido p-cumárico (enhanced chemiluminiscence, ECL detection, Amersham Pharmacia Biotech). La quimioluminiscencia emitida fue detectada a través del programa ImageQuant 350 (GE Health Care) o por exposición a placas autorradiográficas.

3.11. ANÁLISIS DE SINERGISMO

El efecto sinérgico de la combinación de a pares entre las drogas se determinó a partir del método descrito por Kern y colaboradores (Kern et al. 1988). Se define un índice sinérgico

$R = P_{esp} / P_{obs}$ donde:

- P_{esp} corresponde al valor esperado del proceso en consideración (por ejemplo proliferación o colesterogénesis) calculado como el producto del porcentaje remanente luego del tratamiento con la droga A sola multiplicado por el porcentaje remanente del tratamiento con la droga B sola dividido por 100.

- P_{obs} corresponde al porcentaje remanente real observado luego del tratamiento combinado de las drogas A y B.

De esta forma se define sinergismo como cualquier valor de $R > 1$, mientras que un $R = 1$ (efecto aditivo) o inferior indica la ausencia de una interacción sinérgica entre las drogas A y B. Por ejemplo, si en presencia de la droga A la proliferación celular fue del 75% y en presencia de B fue del 50%, mientras que el valor porcentual observado para el tratamiento combinado fue del 30%, entonces el valor calculado de R es:

$$R = \frac{75 \times 50}{30 \times 100} = 1,25$$

Este resultado de $R > 1$ indica la presencia de un efecto sinérgico para dicha combinación.

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales son expresados como el promedio \pm desvío estándar (DS). Para cada ensayo se realizaron al menos 2 experimentos independientes realizados cada uno como mínimo por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$) o utilizando el test "t" de student según corresponda con el software GraphPad inStat (GraphPad inStat, Inc, San Diego, Estados Unidos). Los valores de las concentraciones que inhiben un 50% la proliferación celular (IC50) o la síntesis de colesterol (IC50sc) se calcularon a partir de curvas de regresión no lineales utilizando el programa Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, Estados Unidos). El análisis de las imágenes se llevó a cabo a partir de los programas Image J v.1.47 (National Institute of Health) o Image ProPlus 5.1 (Media Cybernetics Inc, MD, Estados Unidos) según corresponda.

Capítulo 4

**EFFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE
SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR:
MECANISMOS DE ACCIÓN
Y SU COMBINACIÓN CON
SIMVASTATINA**

4.1. EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

Con el objetivo de evaluar la capacidad antiproliferativa de los isoprenoides (linalool y 1,8-cineole) y de la simvastatina, calcular sus IC₅₀ y seleccionar las concentraciones de cada uno de ellos que se utilizaron posteriormente en los ensayos combinados, células de HepG2 y A549 en fase exponencial de crecimiento se trataron con concentraciones crecientes de los distintos compuestos adicionados al medio de cultivo según se describe en el ítem 3.3.4. Los rangos ensayados fueron: 0-3000 μM para LN, 0-10000 μM para CN y 0-80 μM para SV. Luego de 48 horas de tratamiento, se evaluaron la viabilidad y proliferación celular a través de los ensayos de MTT, RN y recuento celular en cámara de Neubauer según se describe en el ítem 3.4.

Con los datos obtenidos se construyeron curvas de inhibición del crecimiento en función de la concentración y por regresión no lineal se calcularon los valores de IC₅₀ para de cada uno de los tres compuestos ensayados.

4.1.1. Ensayo de MTT

El tratamiento con LN produjo una inhibición dosis dependiente de la viabilidad a concentraciones $\leq 3000 \mu\text{M}$ en células HepG2 y $\leq 2000 \mu\text{M}$ en A549. Dicha inhibición resultó estadísticamente significativa a partir de 1000 μM y 800 μM , respectivamente (Figura 4.1, paneles A y B).

Ambas líneas celulares mostraron comportamientos similares cuando se expusieron a concentraciones crecientes de CN. El tratamiento con el CN no presentó efecto antiproliferativo hasta concentraciones de 4000-5000 μM , a partir de las cuales comenzó a observarse un efecto inhibitorio dosis dependiente muy pronunciado hasta alcanzar un máximo de inhibición a concentraciones de 7500 - 8000 μM (Figura 4.1, paneles C y D).

El tratamiento con concentraciones crecientes de SV ocasionó una inhibición dosis-dependiente en el rango de 10 a 40 μM en ambas líneas celulares. Por encima de esa concentración las curvas alcanzaron un *plateau* que se mantuvo hasta la máxima concentración ensayada (80 μM) (Figura 4.1, paneles E y F).

Los valores de IC₅₀ calculados se muestran en la tabla 4.1.

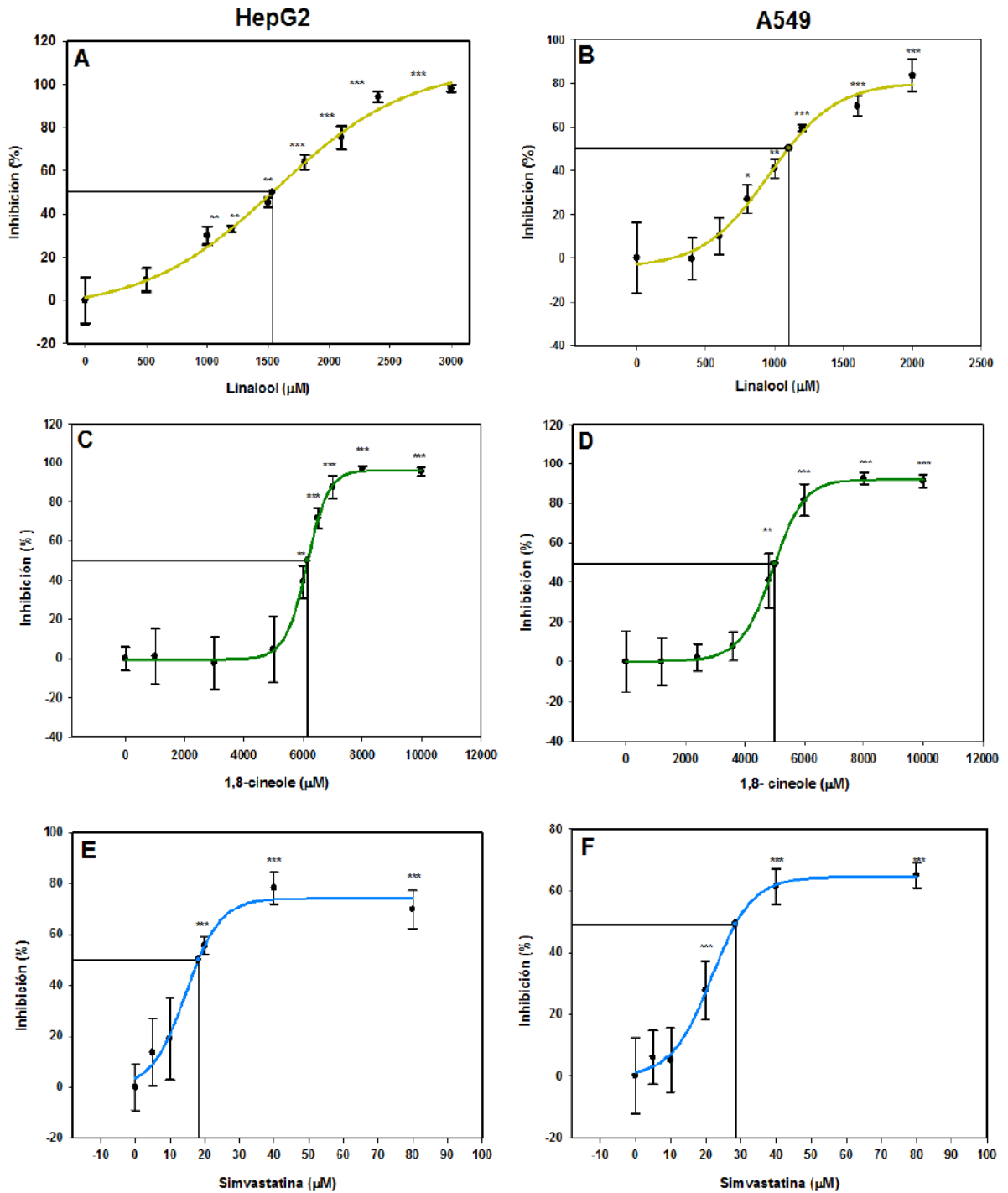


Figura 4.1. Efecto del linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la viabilidad de células HepG2 y A549 determinada por el ensayo de MTT. Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada monoterpeneo y de estatina durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT en las células HepG2 (A, C y E) y A549 (B, D y F). Los datos se expresan como el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Adicionalmente a los ya descritos, se realizaron ensayos de inhibición de la viabilidad y proliferación celular por el método de MTT incubando ambas líneas celulares con concentraciones crecientes de cada isoprenoide y simvastatina durante 24 y 48 horas en medio MEM suplementado con 10% SFB. El efecto antiproliferativo y los IC50 calculados para cada compuesto se muestran en el apéndice II.

4.1.2. Ensayo de Rojo Neutro

A partir de las curvas de inhibición construidas (Figura 4.2) se observó que tanto el efecto inhibitorio de los isoprenoides y la simvastatina como los valores de IC50 calculados (Tabla 4.1) fueron comparables a los obtenidos mediante el ensayo de MTT.

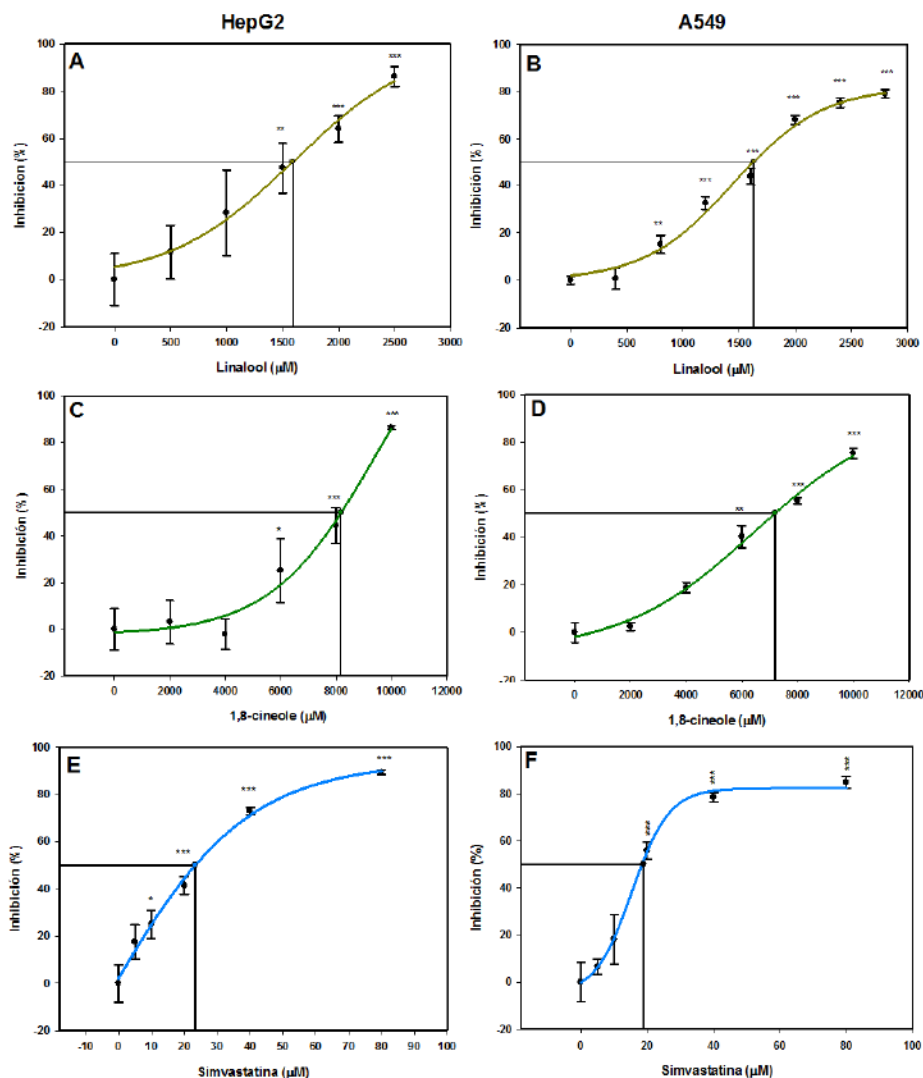


Figura 4.2. Inhibición de la viabilidad celular mediada por linalool, 1,8-cineole y simvastatina determinada por el ensayo de RN. Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada isoprenoide y de simvastatina durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de RN en las células HepG2 (A, C y E) y A549 (B, D y F). Los datos se expresan como el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3. Recuento celular

El recuento de células, una metodología que evidencia de forma directa la proliferación celular, se realizó utilizando una cámara de Neubauer según se describe en el ítem 3.4.3. Dado que para todas las concentraciones ensayadas el porcentaje de células que excluyen el colorante (células viables) durante el recuento fue igual o mayor al 90%, se consideró el número de células viables como el número de células totales presentes. Las curvas de inhibición de la proliferación confirman los resultados obtenidos en los ensayos empleados anteriormente (Figura 4.3). Los valores de IC50 determinados se presentan en la Tabla 4.1.

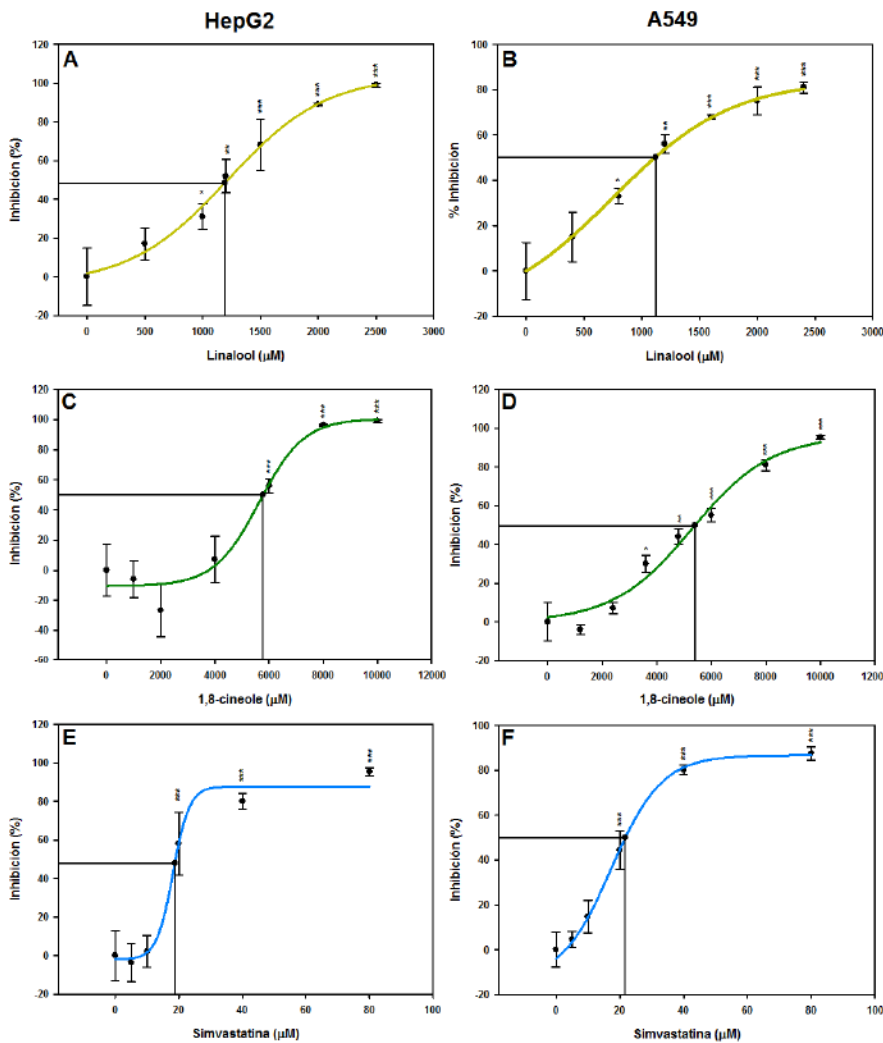


Figura 4.3. Inhibición de la proliferación de células HepG2 y A549 determinada por recuento celular. Las células creciendo exponencialmente fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada monoterpreno y simvastatina durante 48 horas. La proliferación celular se determinó por el recuento de células HepG2 (paneles A, C y E) y A549 (paneles B, D y F) en cámara de Neubauer. Los datos se expresan como el promedio \pm DS (n=4); *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001.

Tabla 4.1. Actividad antiproliferativa de linalool, 1,8-cineole y simvastatina en células HepG2 y A549

	HepG2			A549		
	IC ₅₀ (μM)			IC ₅₀ (μM)		
	NC	MTT	RN	NC	MTT	RN
Linalool	1190 ± 156	1550 ± 98	1600 ± 70	1160 ± 133	1100 ± 41	1750 ± 190
1,8-cineole	5770 ± 63	6050 ± 163	8180 ± 110	5370 ± 186	5030 ± 203	7110 ± 240
Simvastatina	18,9 ± 1,9	18,2 ± 1,1	23,0 ± 1,2	21,6 ± 0,8	27,5 ± 1,9	19,2 ± 1,2

Células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes de LN, CN y SV durante 48 horas. La viabilidad y proliferación celular se determinaron por recuento del número de células (NC), MTT y RN. Se construyeron curvas dosis-respuesta y por regresión no lineal se calcularon los IC₅₀ a partir de las mismas. Los resultados se expresan como promedio ± DS de tres experimentos independientes realizados al menos por triplicado.

Teniendo en cuenta que los valores de IC₅₀ obtenidos por los distintos métodos son próximos entre sí, se utilizaron como referencia para los posteriores experimentos de esta tesis doctoral los obtenidos a partir de los ensayos de MTT.

4.2. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LINALOOL Y 1,8-CINEOLE

4.2.1. Determinación de apoptosis

Para evaluar el posible efecto pro-apoptótico del linalool y 1,8-cineole, se trató a las células con estos isoprenoides a distintas concentraciones y/o tiempos de incubación y se estudió la inducción de apoptosis a través de diferentes metodologías. En una primera instancia se evaluó la activación de la cascada apoptótica mediante la detección por Western blot de caspasa-3. Luego se estudió la actividad proteolítica de caspasa-3 y finalmente se analizó la fragmentación del ADN nuclear mediante el ensayo de TUNEL.

Dado que la actividad pro-apoptótica de la simvastatina está ampliamente documentada para células HepG2 y A549 (Relja et al. 2010; Hwang et al. 2011), y con el propósito de

seleccionar las concentraciones a ser utilizadas en los ensayos combinados con cada monoterpeno, se determinó el efecto de la simvastatina sobre la inducción de apoptosis sólo por el método de TUNEL.

4.2.1.1. Estudio del clivaje de caspasa-3

La caspasa-3 es una enzima proteolítica clave de la cascada apoptótica que pertenece al grupo de las cistein-proteasas, enzimas que reconocen específicamente residuos aspartato y producen el clivaje proteico en dicho sitio. La caspasa-3 se expresa en células como un precursor inactivo de aproximadamente 32 KDa (procaspasa-3) el cual es escindido proteolíticamente durante la apoptosis generando las 2 subunidades de caspasa-3 madura de 12 y 17 KDa. La detección de la presencia de estas subunidades es un marcador inequívoco de la activación de la vía apoptótica.

Células HepG2 y A549 en fase exponencial de crecimiento se trataron durante 24 y 48 horas con concentraciones de LN y CN correspondientes a sus IC50. Células tratadas con DMSO 3% (HepG2) ó 5% (A549) se utilizaron como control positivo de la inducción del clivaje de la procaspasa-3. A partir de homogenatos celulares obtenidos como se indicó en la sección 3.10.2.2, se realizaron los Western blot correspondientes.

En las condiciones estudiadas, no se detectó la presencia de las subunidades maduras de caspasa-3 (de 17 y 12 KDa) en ninguna de las dos líneas celulares tratadas con LN o CN. Como era de esperarse, el tratamiento con elevadas concentraciones de DMSO produjo el clivaje del precursor y la consecuente aparición de las bandas características de caspasa-3, principalmente en la línea celular HepG2. En la figura 4.4 se observan los Western blot para las muestras de células HepG2 y A549 tratadas durante 48 horas.

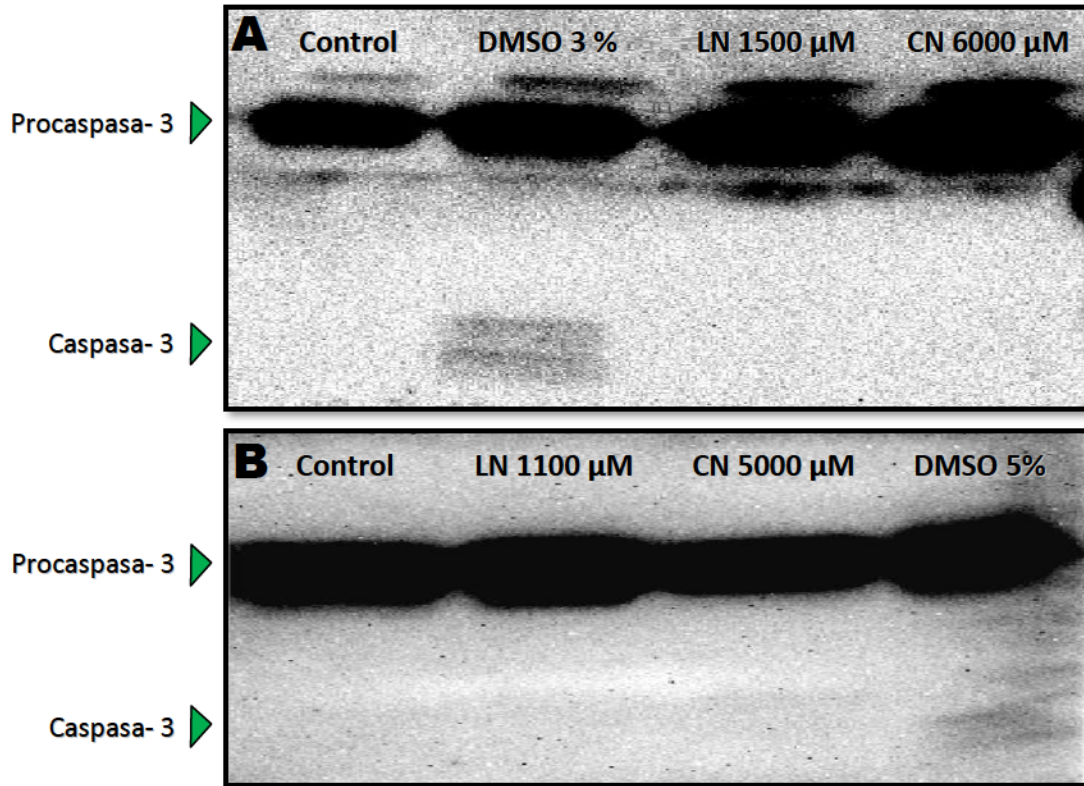


Figura 4.4. Western Blot de caspasa-3 en células HepG2 y A549. Figura representativa del clivaje de pro caspasa- 3 (32 KDa) para dar caspasa- 3 madura (17 KDa) en homogenato de células HepG2(A) y A549 (B) tratadas con DMSO 0,2% como Control, DMSO 3 o 5% (control positivo de la inducción de caspasa-3) y concentraciones de LN y CN correspondientes a sus IC50 durante 48 horas.

4.2.1.2. Evaluación de la actividad de caspasa-3

Dado que no fue posible evidenciar la presencia de caspasa-3 a partir de los ensayos de Western blot, se procedió a utilizar otra metodología para evaluar la posible activación de la enzima a partir de los tratamientos con los isoprenoides. En este caso se escogió la determinación de su actividad proteolítica a partir de un ensayo colorimétrico.

Células HepG2 en fase exponencial de crecimiento se trataron durante 12, 24 y 48 horas con las concentraciones de LN, CN y DMSO idénticas a las detalladas en el ítem anterior.

Finalizados los tratamientos se obtuvieron homogenatos celulares a partir de los cuales se determinó la actividad de caspasa-3 según lo detallado en la sección 3.6.1.

En células tratadas con CN, la actividad proteolítica de caspasa-3 no se vio incrementada a ninguno de los tiempos ensayados. Por el contrario, la incubación con este monoterpreno durante 12 horas produjo una reducción de la actividad enzimática (Figura 4.5).

En células tratadas con LN se observó un incremento significativo de la actividad de caspasa-3 sólo a las 48 horas. Los tratamientos durante 24 y 48 horas con DMSO 3% provocaron un aumento del clivaje de Ac-DEVD-pNA por parte de la caspasa-3, y la consecuente liberación de p-NA de alrededor de 4 veces el obtenido para células control (Figura 4.5).

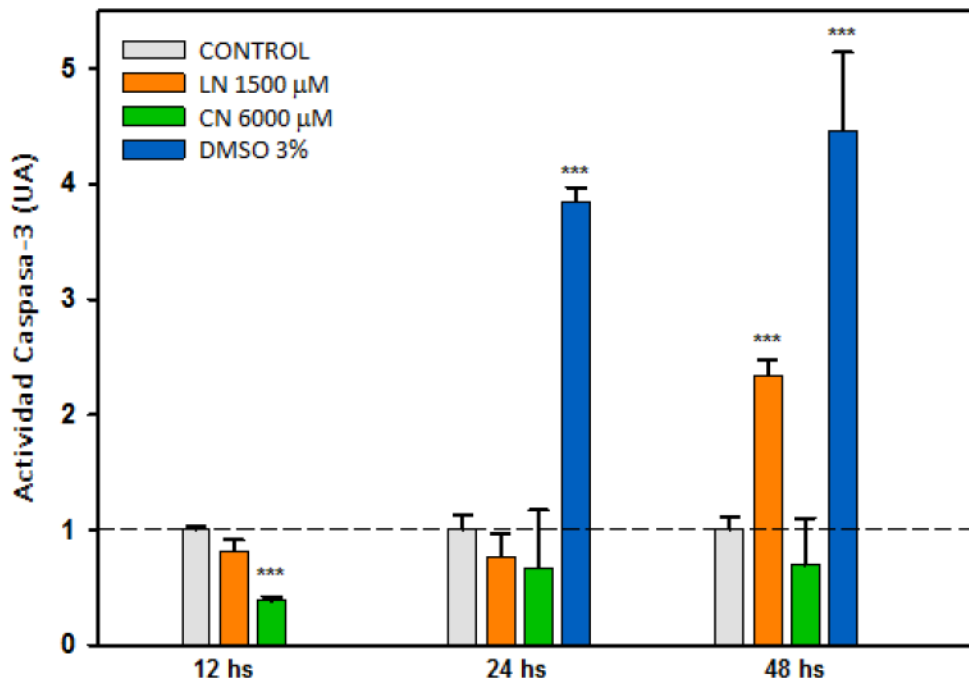


Figura 4.5. Actividad de caspasa-3 en células HepG2. Se determinó la actividad caspasa-3 en homogenato de células HepG2 tratadas con DMSO 0,2% (control), LN1500 µM, CN 6000 µM y DMSO 3% (control positivo de la inducción de apoptosis vía caspasa-3). Los valores se expresan como actividad enzimática en unidades arbitrarias (UA), calculadas como la absorbancia a 405 nm normalizada al número de células, asignando el valor de 1.0 al control y muestran el promedio \pm DS (n=3); *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001.

4.2.1.3. Detección de células apoptóticas mediante el ensayo de TUNEL

En el ítem anterior se evidenció un efecto pro-apoptótico del tratamiento con la IC50 de LN durante 48 horas en células HepG2 sin observarse efecto alguno para la IC50 de CN. Con la finalidad de confirmar este comportamiento, estudiar además su acción sobre la línea celular

pulmonar, así como también ampliar el rango de concentraciones evaluadas y definir las concentraciones efectivas de simvastatina como agente pro-apoptótico, se determinó apoptosis celular a partir del ensayo de TUNEL.

Células HepG2 y A549 creciendo sobre cubreobjetos de 24x24 mm se trataron con LN y CN a concentraciones de $\frac{1}{2}$ IC50, IC50 y de aproximadamente el doble de su IC50 y con SV 5, 20 y 50 μM (HepG2) o SV 10, 25 y 50 μM (A549) durante 48 horas. Posteriormente se procedió a lavarlas, fijarlas, permeabilizarlas y tratarlas con el kit de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL) de Roche® según lo detallado en la sección 3.6.2.

En las figuras 4.6 y 4.7 se presentan las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia para los tratamientos en ambas líneas celulares mientras que en la figura 4.8 se muestran los resultados de la cuantificación de células apoptóticas.

En los tratamientos con concentraciones de cada isoprenoide correspondientes a sus IC50 solo se evidenció un aumento significativo de la apoptosis en células HepG2 tratadas con LN, lo que concuerda y reafirma lo determinado mediante los ensayos de actividad de caspasa-3. Sin embargo, cuando se trató a las células con concentraciones de isoprenoides que duplican su IC50 se observó que el linalool indujo apoptosis fuerte en HepG2 y moderada en A549; mientras que prácticamente la totalidad de las células de ambas líneas tratadas con 1,8-cineole resultaron apoptóticas.

Simvastatina resultó ser un inductor moderado de la apoptosis en células HepG2 a 20 μM y 50 μM ; en tanto que en A549 la proporción de células apoptóticas fue más pronunciada y significativa a partir de 25 μM .

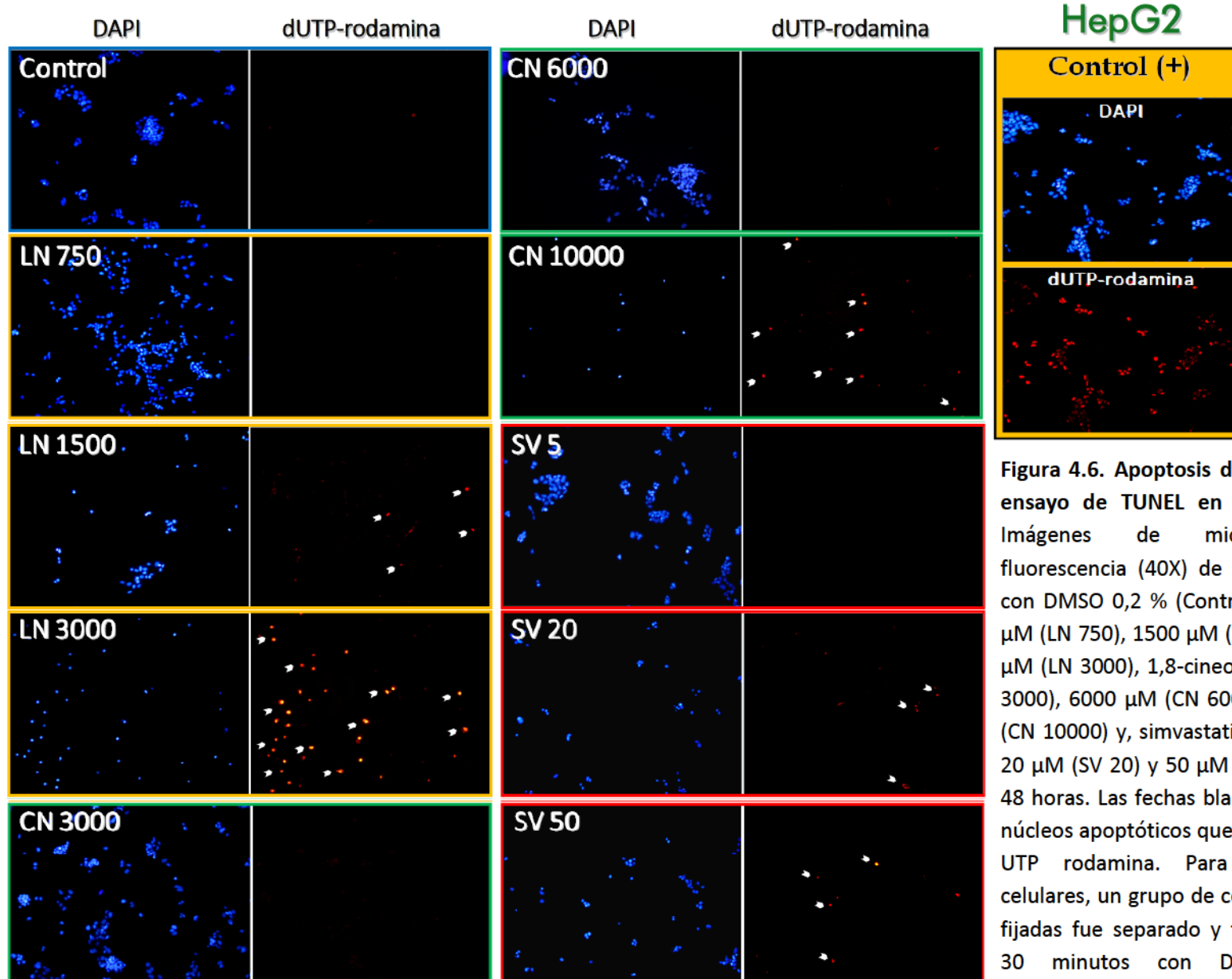


Figura 4.6. Apoptosis determinada por ensayo de TUNEL en células HepG2. Imágenes de microscopía de fluorescencia (40X) de células tratadas con DMSO 0,2 % (Control), linalool 750 μM (LN 750), 1500 μM (LN 1500) y 3000 μM (LN 3000), 1,8-cineole 3000 μM (CN 3000), 6000 μM (CN 6000) y 10000 μM (CN 10000) y, simvastatina 5 μM (SV 5), 20 μM (SV 20) y 50 μM (SV 50) durante 48 horas. Las flechas blancas señalan los núcleos apoptóticos que incorporaron d-UTP rodamina. Para ambos tipos celulares, un grupo de células control ya fijadas fue separado y tratado durante 30 minutos con DNAsa (Control positivo).

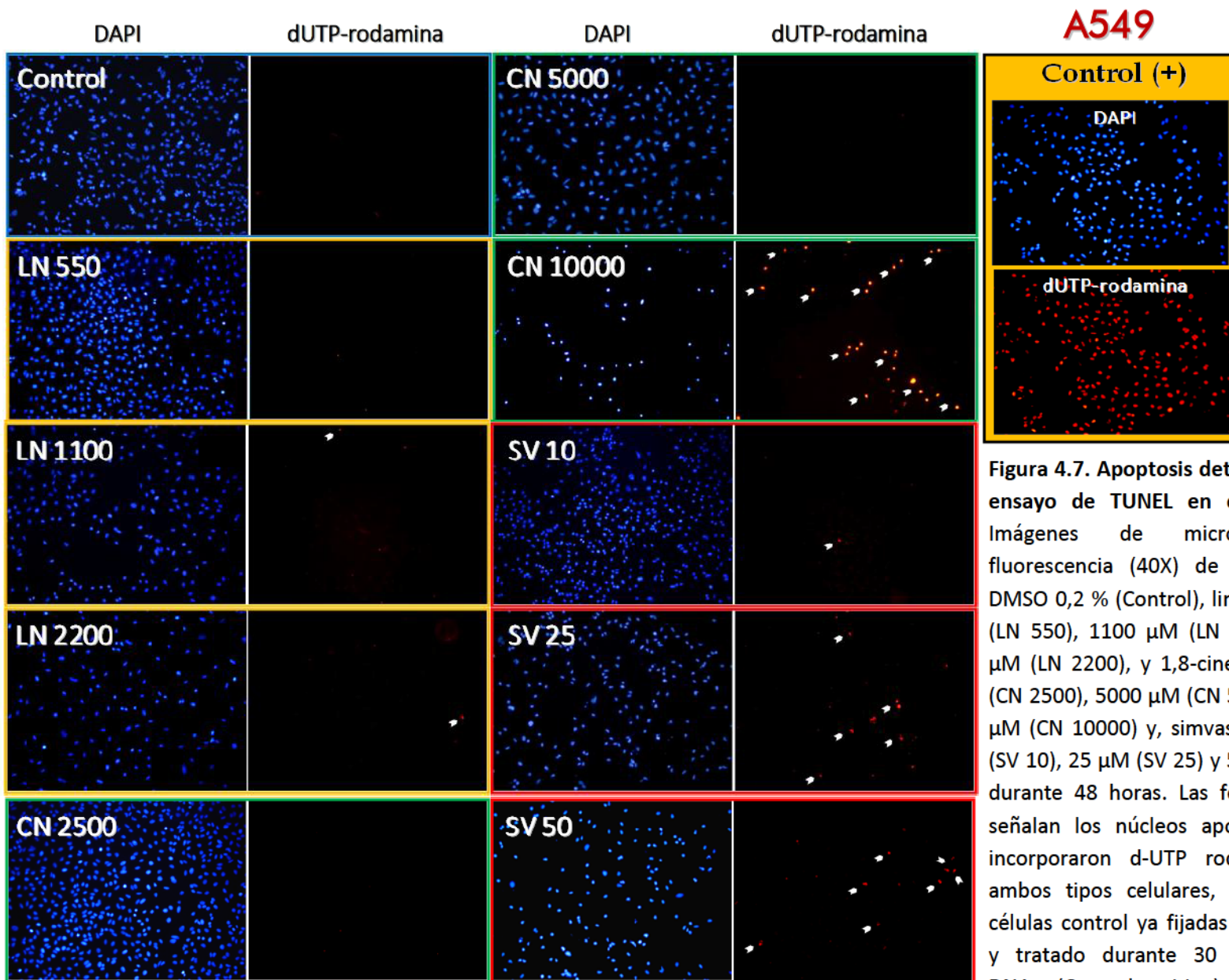


Figura 4.7. Apoptosis determinada por ensayo de TUNEL en células A549. Imágenes de microscopía de fluorescencia (40X) de tratadas con DMSO 0,2 % (Control), linalool 550 μM (LN 550), 1100 μM (LN 1100) y 2200 μM (LN 2200), y 1,8-cineole 2500 μM (CN 2500), 5000 μM (CN 5000) y 10000 μM (CN 10000) y, simvastatina 10 μM (SV 10), 25 μM (SV 25) y 50 μM (SV 50) durante 48 horas. Las flechas blancas señalan los núcleos apoptóticos que incorporaron d-UTP rodamina. Para ambos tipos celulares, un grupo de células control ya fijadas fue separado y tratado durante 30 minutos con DNAsa (Control positivo).

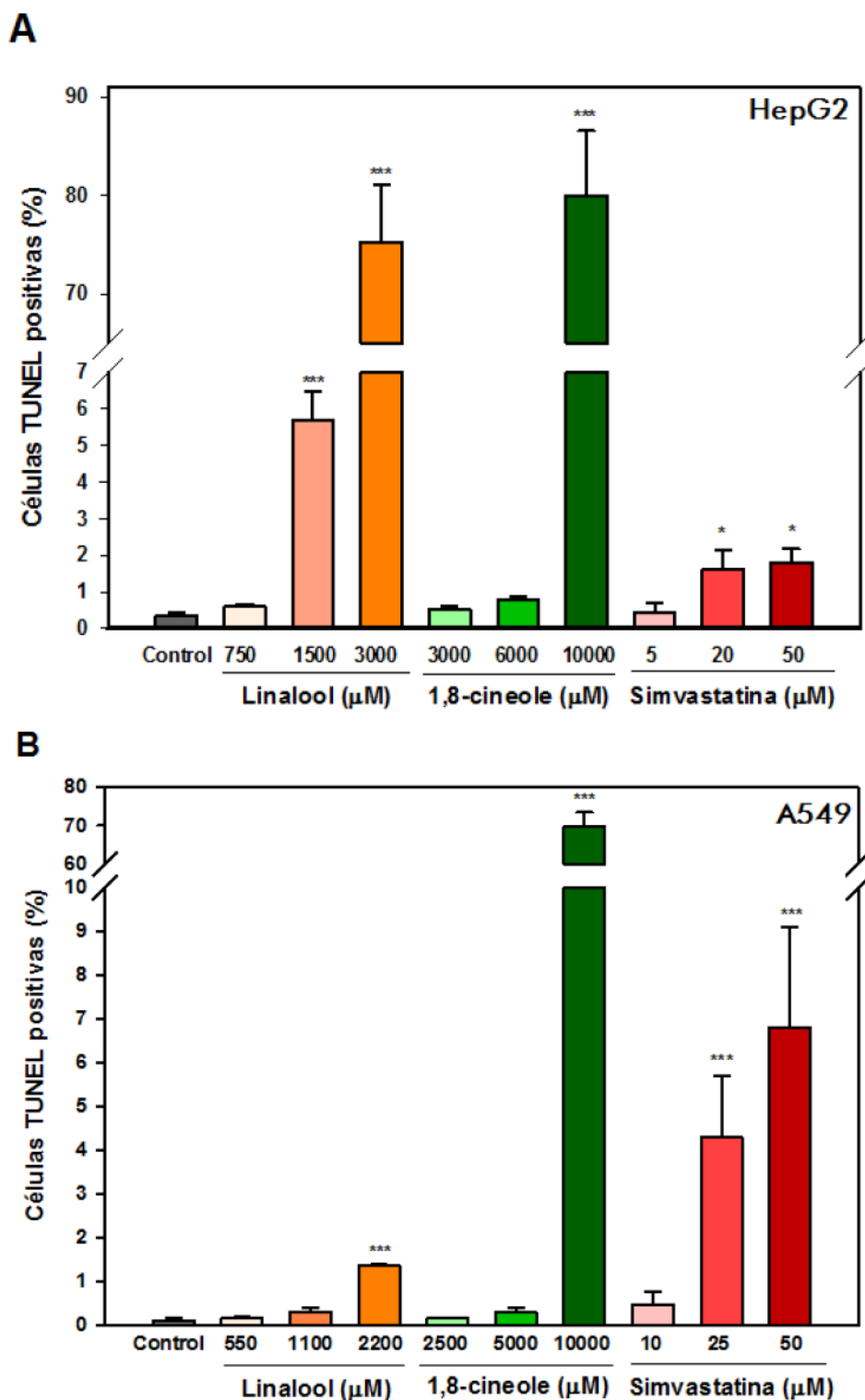


Figura 4.8. Porcentaje de células apoptóticas determinadas mediante ensayo de TUNEL. El porcentaje células apoptóticas fue cuantificado y los valores muestran el promedio \pm DS ($n=3$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Los resultados obtenidos en los estudios de apoptosis demostraron que, para las condiciones en las cuales se encuentra inhibida la proliferación celular en un 50% en ambas líneas celulares, sólo el linalool en células HepG2 es capaz de inducir apoptosis significativamente. Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos antiproliferativos ejercidos por ambos monoterpenos se realizaron ensayos para analizar el efecto de estos isoprenoides sobre el ciclo celular.

Las células hepáticas (HepG2) y extrahepáticas (A549) se trataron durante 24 horas con concentraciones de linalool y 1,8-cineole próximas a la mínima inhibitoria y a la IC50. Se determinó la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular cuantificando el IP presente en cada célula por citometría de flujo según se describe en el ítem 3.5.

En cultivos control de células HepG2 el 40% de la población se encontró en fase G0/G1, el 47% en fase S y el 13% en G2/M. El tratamiento de estas células con concentraciones de LN \geq 1000 μ M ocasionó un aumento significativo de la población en fase G0/G1 (aprox. 25%); en tanto que para los tratamientos con CN, el arresto se observó a partir de 4000 μ M pero resultó estadísticamente considerable a partir de 6000 μ M donde el 48% de la población se encontró en fase G0/G1. En ambos casos, este fenómeno se vio acompañado de una disminución de la proporción de células en fase S, que descendió un 27% en los tratamientos con LN (1000 y 1500 μ M) y un 15% con CN 6000 μ M. Por otra parte, no se observaron cambios notorios en la proporción de células en fase G2/M (Figura 4.9, panel A).

En cultivos de células A549 los monoterpenos ocasionaron un arresto del ciclo celular en G0/G1 más pronunciado que en las células hepáticas a las concentraciones estudiadas. Se observó un incremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 del 38-40% cuando las células se trataron con LN (1000 y 1500 μ M) y del 40-24% en tratamientos con CN (4000 y 6000 μ M). Acompañando al arresto en G0/G1, se registró un marcado descenso de la población de células en fase S que resultó ser superior al 50% en todos los casos. Para el tratamiento con CN 6000 μ M se produjo además un aumento significativo de la población en fase G2/M (Figura 4.9, panel B).

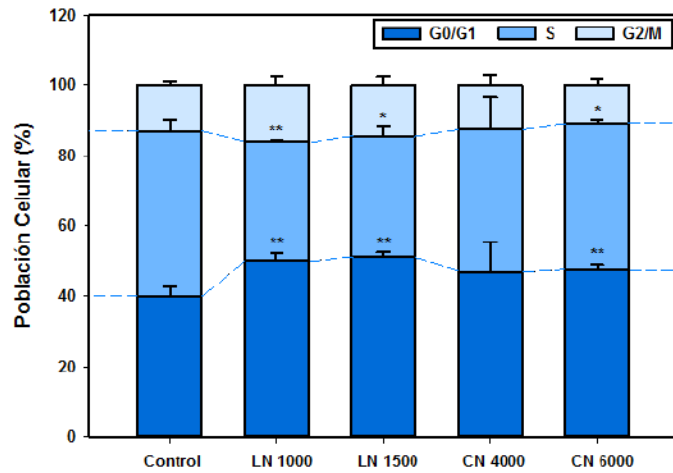
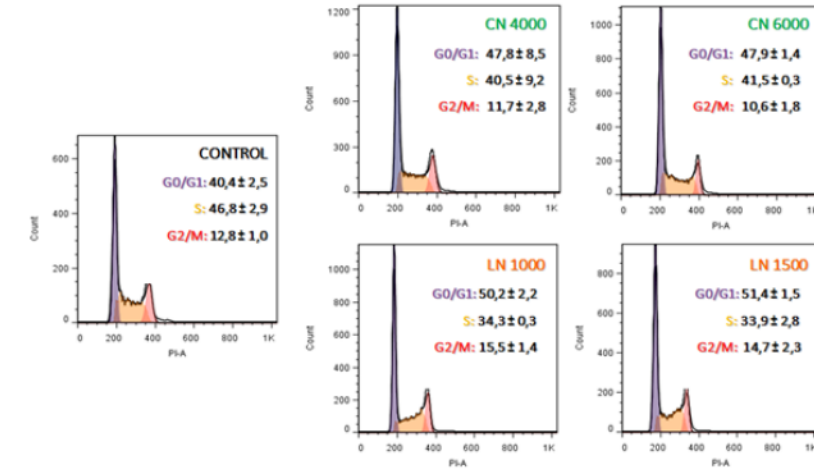
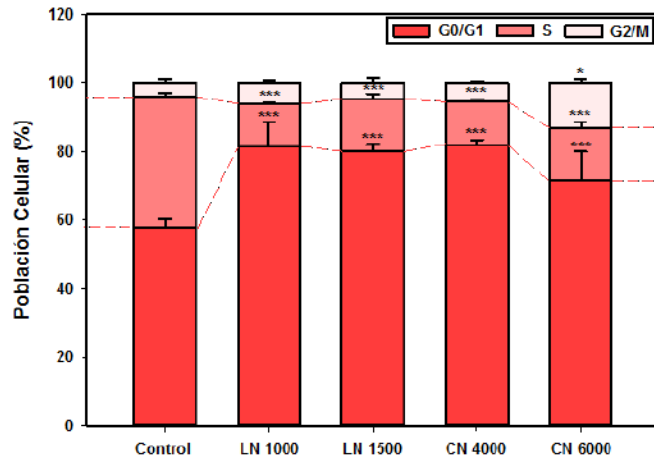
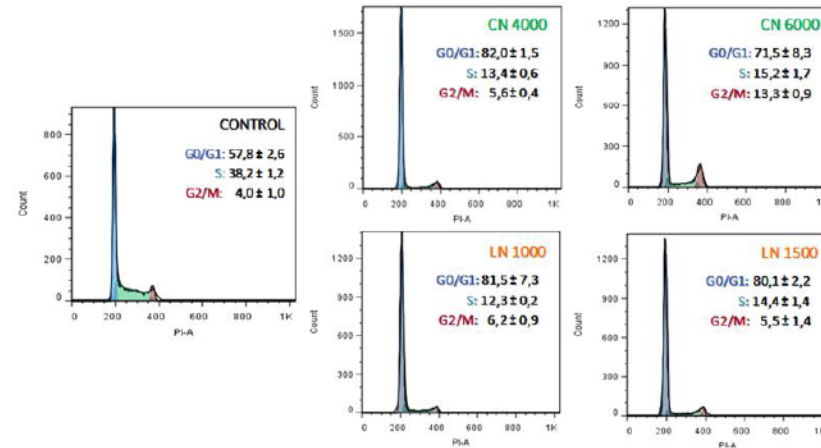
A**HepG2****B****A549**

Figura 4.9. Arresto del ciclo celular mediado por linalool y 1,8-cineole en células HepG2 (A) y A549 (B). Análisis del ciclo celular en células tratadas durante 24 horas con linalool 1000 μ M (LN 1000) y 1500 μ M (LN 1500) o 1,8-cineole 4000 μ M (CN 4000) y 6000 μ M (CN 6000). Los resultados se expresan como porcentaje de células de la población en cada fase del ciclo celular. Las figuras muestran el promedio \pm DS (n=3); (*) p <0,05; () p <0,01; (***) p <0,001.**

4.2.3. Adición de mevalonato exógeno

Como se mencionó anteriormente, una de las hipótesis planteadas acerca del efecto antiproliferativo de algunos isoprenoides está relacionada con su efecto inhibitorio sobre la HMGCR, que daría por resultado un desabastecimiento de intermediarios de la VM necesarios para la síntesis de colesterol y la prenilación de proteínas. Para evidenciar si el efecto antiproliferativo observado con ambos monoterpenos y la HMGCR están relacionados, se evaluó si la adición de mevalonato exógeno es capaz de restablecer el crecimiento celular. Para ello, se trató a células de ambas líneas con distintas concentraciones de cada isoprenoide, en presencia o ausencia de mevalonato 0,5 mM en el medio de cultivo durante 48 horas.

En ningún caso la presencia de mevalonato fue capaz de revertir la acción inhibitoria de la proliferación promovida por los isoprenoides. Para validar el experimento, las células se trataron en paralelo con concentraciones cercanas al IC50 de simvastatina, con o sin agregado de mevalonato. Como era de esperarse, el agregado de mevalonato exógeno restableció la proliferación de las células tratadas con la estatina. Los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

	HepG2			A549	
	- Mv	+ Mv		- Mv	+ Mv
Control	100 ± 7,7	106,4 ± 14,7	Control	100 ± 12,8	102,7 ± 13,6
LN 1000 µM	94,3 ± 10,9	84,0 ± 13,0	LN 800 µM	73,7 ± 5,3	62,9 ± 7,3
LN 1500 µM	62,1 ± 11,2	67,8 ± 9,0	LN 1200 µM	55,5 ± 6,1	61,2 ± 3,4
LN 2000 µM	47,7 ± 3,8	43,6 ± 5,7	LN 2000 µM	43,6 ± 5,8	45,4 ± 5,8
CN 4000 µM	98,2 ± 13,6	101,7 ± 9,8	CN 3000 µM	86,3 ± 10,1	81,0 ± 12,1
CN 6000 µM	56,0 ± 13,6	54,9 ± 9,5	CN 5000 µM	58,2 ± 2,5	64,3 ± 11,3
CN 8000 µM	46,9 ± 13,1	44,4 ± 11,3	CN 8000 µM	43,0 ± 6,8	48,6 ± 4,5
SV 20 µM	41,4 ± 6,5	114,0 ± 19,1**	SV 25 µM	62,1 ± 5,2	79,4 ± 8,3*

Células HepG2 y A549 fueron tratadas con LN, CN o SV con o sin mevalonato 0,5 mM (Mv) durante 48 horas. La proliferación y viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT. Los datos, que se presentan como porcentaje del control, muestran el promedio ± DS (n=4). *p <0,05; **p <0,001 comparado con igual tratamiento sin agregado de Mv.

4.2.4. Análisis de Ras en las fracciones subcelulares

Como se mencionó anteriormente, la inhibición de la prenilación de proteínas de la familia Ras es otro de los mecanismos propuestos a través del cual los monoterpenos ejercen su efecto antiproliferativo.

Se escogió al linalool como monoterpeno modelo para estudiar su efecto sobre Ras en las distintas fracciones subcelulares, ya que posee un efecto antiproliferativo mucho más potente que 1,8-cineole. Para ello, se trataron células HepG2 con LN 1000 y 1500 μM durante 24 horas o LN 750, 1000 y 1500 μM durante 48 horas en medio MEM suplementado con SFB 10% y se determinaron los niveles de Ras en homogenato total y en las fracciones citosólica y de membrana obtenidas según lo descrito en la sección 3.10.2.3 (Figura 4.10).

Los tratamientos durante 24 horas provocaron una inhibición cercana al 30-35% de la traslocación de Ras a membrana para ambas concentraciones ensayadas (Figura 4.11, panel A), mientras que en células tratadas durante 48 horas los niveles de la proteína en esta fracción disminuyeron hasta un 50%, siendo este fenómeno significativo desde la concentración más baja empleada (750 μM). El tratamiento con LN 1500 μM durante 48 horas provocó además un incremento de Ras tanto en la fracción citosólica (Figura 4.11, panel B) como en homogenato total (Figura 4.9, panel C) sin observarse cambios para las demás condiciones estudiadas.

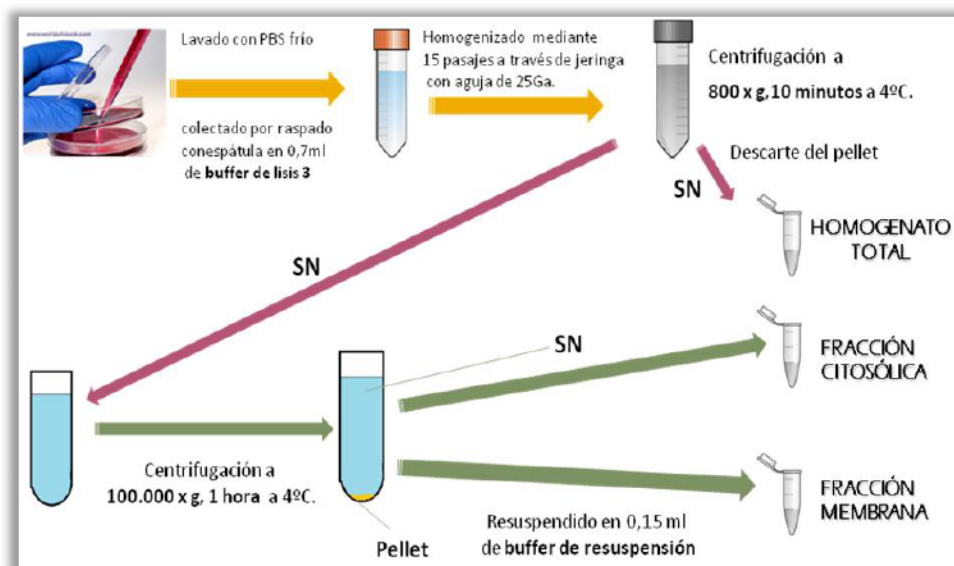


Figura 4.10. Obtención de las fracciones subcelulares citosólica y de membrana. Se presenta de forma simplificada la metodología empleada para la obtención de las distintas fracciones subcelulares según lo descrito en la sección 3.10.2.3. SN: sobrenadante.

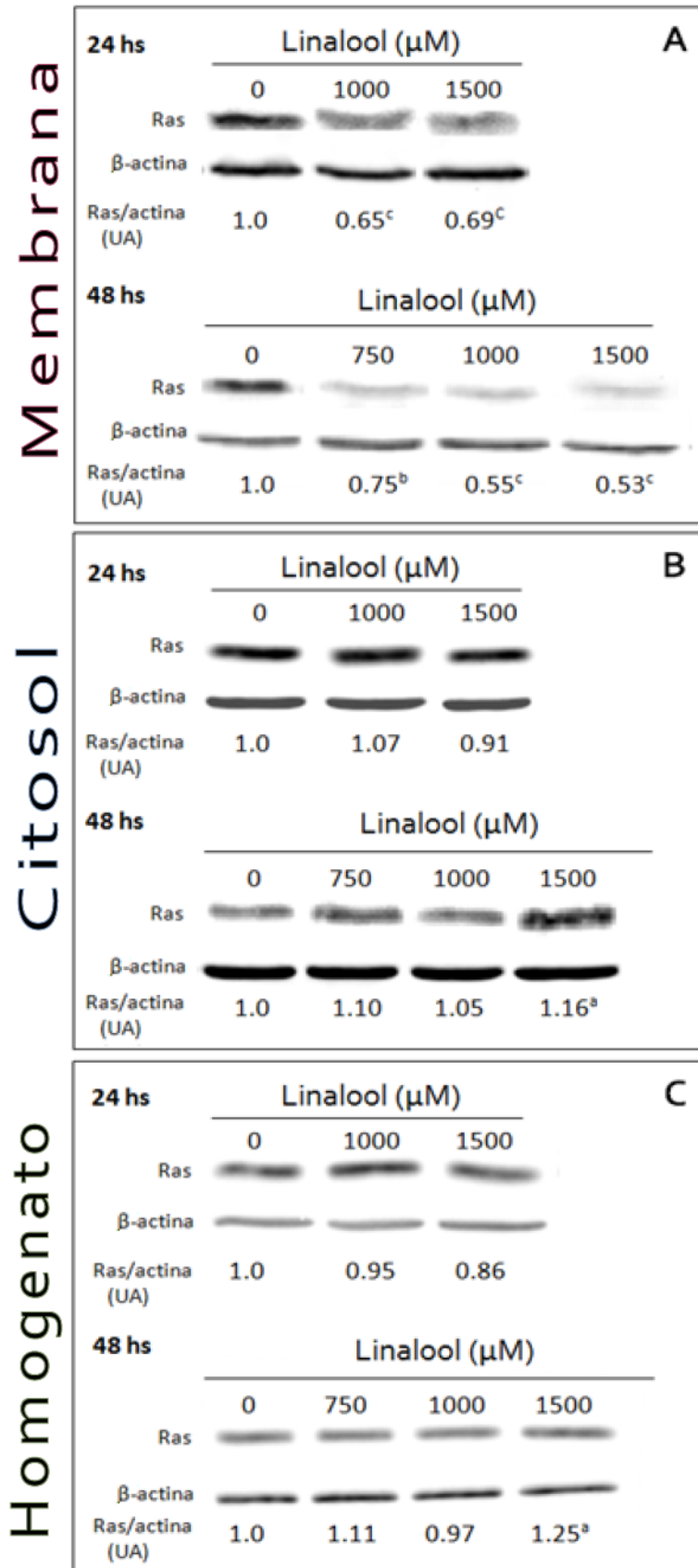


Figura 4.11. Efecto del linalool sobre los niveles de Ras y su traslocación a membrana en células HepG2. Representación de los análisis de Western blot para la fracción membrana (A), fracción citosólica (B) y homogenato celular (C). Las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría, se utilizó la inmunodetección de β -actina como control de carga de las calles. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA), como la intensidad de la banda de Ras corregida por la correspondiente de β -actina, asignando un valor de 1.0 a los controles. Los datos representan el promedio \pm DS ($n=4$); (a) $p < 0,05$; (b) $p < 0,01$; (c) $p < 0,001$.

4.3. EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE A PARES ENTRE LINALOOL, 1,8-CINEOLE Y SIMVASTATINA

4.3.1. Proliferación y viabilidad celular

Con el propósito de analizar el potencial efecto sinérgico de la combinación entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina, células en fase exponencial de crecimiento se trataron con los compuestos adicionados individualmente o combinados de a pares. Se utilizaron concentraciones sub-óptimas de cada uno, las cuales no inhiben la proliferación individualmente: $\frac{1}{2}$ IC50 para ambos monoterpenos y SV 5 μ M (HepG2) o 10 μ M (A549). La viabilidad y proliferación celular se determinaron mediante los ensayos de MTT, RN y recuento celular. Se calcularon los valores del índice de sinergismo (R) según se detalló en la sección 3.11. Como se mencionó anteriormente, todo valor de $R > 1$ indica un efecto sinérgico en la combinación de ambos compuestos mientras que un $R \leq 1$ responde a la ausencia de sinergismo.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la acción combinada de ambos monoterpenos produjo una inhibición significativa de la viabilidad y proliferación en ambas líneas tumorales, con valores de $R > 1$ en todos los casos, indicando que LN y CN actúan sinérgicamente, siendo el efecto algo más pronunciado en células HepG2 (Figura 4.12).

La acción combinada de ambos monoterpenos y de cada uno de ellos con la estatina provocó un efecto sinérgico antiproliferativo en ambas líneas celulares que se evidenció para cada uno de los 3 ensayos empleados ya que, si bien los valores de R obtenidos son variables, en todos los casos fueron mayor a 1 (Figura 4.12).

Para confirmar el efecto sinérgico inhibitorio que produce de la combinación de estos isoprenoides naturales, y de cada uno de ellos con simvastatina, se emplearon nuevas combinaciones a diferentes concentraciones y se determinó la viabilidad y proliferación por el ensayo de MTT. Como puede observarse en la Tabla 4.3, la mayoría de las combinaciones resultaron en una notoria interacción sinérgica.

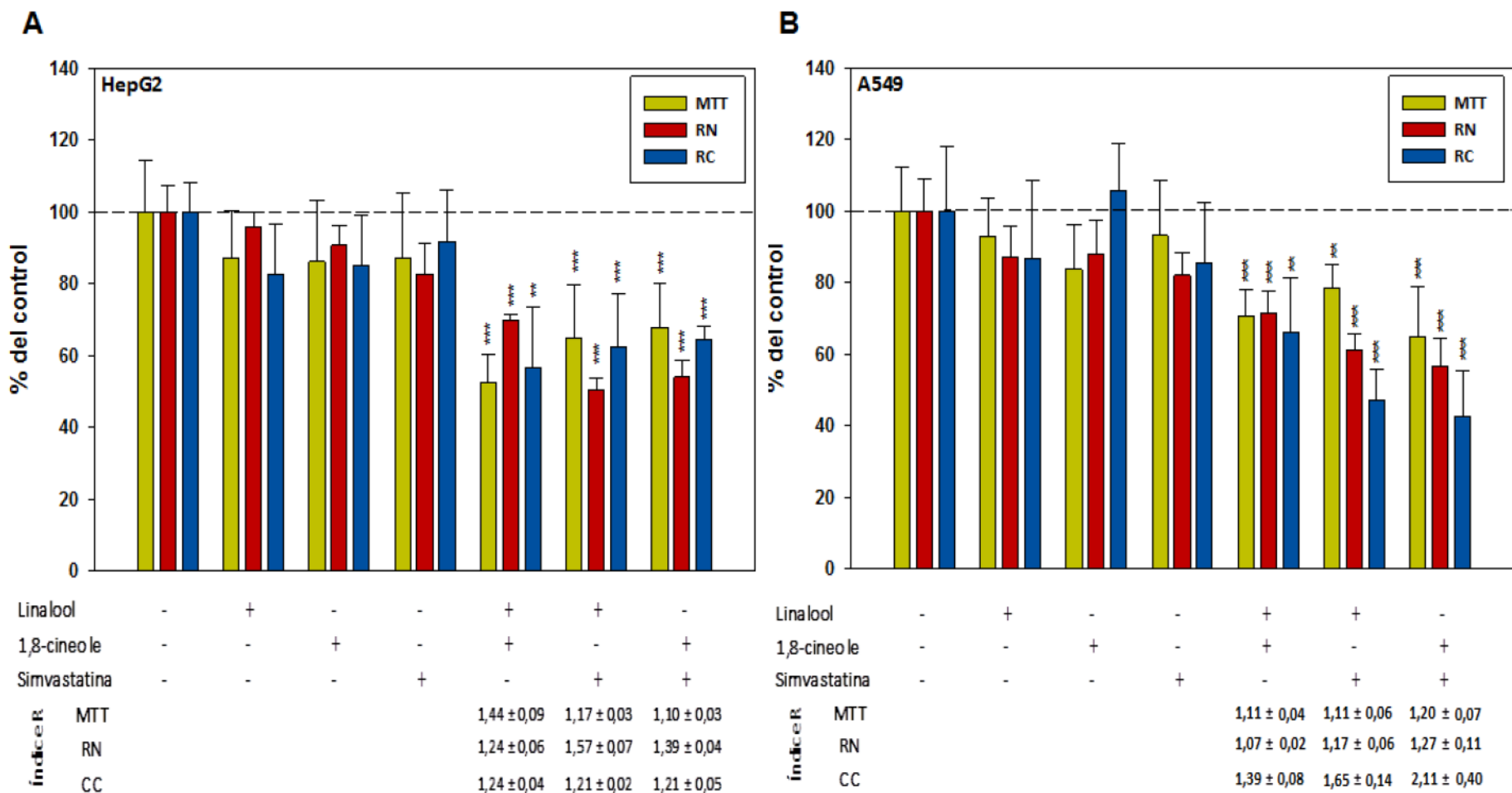


Figura 4.12. Efecto de la combinación de linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la viabilidad y proliferación de células HepG2 (A) y A549 (B). Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con múltiples combinaciones de a pares de los tres compuestos a diferentes concentraciones durante 48 horas. La viabilidad y proliferación fueron determinadas mediante los ensayos de MTT, RN y recuento celular (RC). El efecto sinérgico fue evaluado calculando el índice R como se describió anteriormente. Un $R > 1$ indica sinergismo, mientras que un $R = 1$ (efecto aditivo) o inferior implica ausencia de sinergismo. Los resultados están expresados como el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$. El índice R se calculó a partir de dos experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado.

Tabla 4.3. Combinaciones múltiples de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina a diferentes concentraciones

HepG2											
LN	500 μ M	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	1000 μ M	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
CN	2000 μ M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	4000 μ M	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
SV	5 μ M	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
	10 μ M	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Índice R		1,91 \pm 0,30	1,57 \pm 0,04	2,46 \pm 0,91	3,62 \pm 0,84	1,15 \pm 0,08	1,48 \pm 0,19	1,39 \pm 0,09	2,11 \pm 0,04	1,03 \pm 0,11	1,22 \pm 0,12

A549											
LN	400 μ M	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	800 μ M	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
CN	2000 μ M	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	4000 μ M	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
SV	5 μ M	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
	10 μ M	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Índice R		1,46 \pm 0,05	2,06 \pm 0,09	1,72 \pm 0,33	1,99 \pm 0,18	1,57 \pm 0,09	1,76 \pm 0,21	1,65 \pm 0,11	2,47 \pm 0,43	1,00 \pm 0,04	1,30 \pm 0,01

Células HepG2 y A549 en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con múltiples combinaciones de a pares entre LN, CN y SV durante 48 horas. La viabilidad y proliferación celular se determinó mediante el ensayo de MTT. El índice R se calculó a partir de tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado.

4.3.2. Determinación de apoptosis por el método de TUNEL

En la sección anterior se demostró que la combinación de $\frac{1}{2}$ IC50 de los monoterpenos entre sí o de cada uno de ellos con simvastatina 5 μ M (HepG2) o 10 μ M (A549) provocó una interacción sinérgica inhibitoria sobre la viabilidad y proliferación celular, que fue confirmada por 3 métodos diferentes (Figura 4.9). Si bien cada uno de estos compuestos individualmente no es capaz de inducir apoptosis a las concentraciones mencionadas (sección 4.2.1.3), su combinación de a pares podría inducir apoptosis, siendo este mecanismo uno de los responsables del efecto sinérgico observado. Para comprobar esta hipótesis, células HepG2 y A549 fueron tratadas durante 48 horas con LN, CN y SV a las concentraciones antes referidas, individualmente o con las combinaciones pertinentes, y se evaluó apoptosis celular mediante el ensayo de TUNEL según lo descrito en el ítem 3.6.2.

La combinación entre ambos isoprenoides produjo un aumento considerable de células apoptóticas en la línea HepG2, que resultó estadísticamente significativo tanto respecto al control como a los tratamientos individuales con LN y CN. Por otro lado, no se evidenció inducción de apoptosis en células A549 al combinar los monoterpenos a sus respectivas $\frac{1}{2}$ IC50 (Figura 4.13, panel A).

Al evaluar las combinaciones de a pares entre cada isoprenoide con simvastatina se encontró, en ambas líneas celulares y para cada combinación evaluada, un incremento significativo de la apoptosis, diferenciándose de lo observado para los tratamientos individuales (Figura 4.13, panel A).

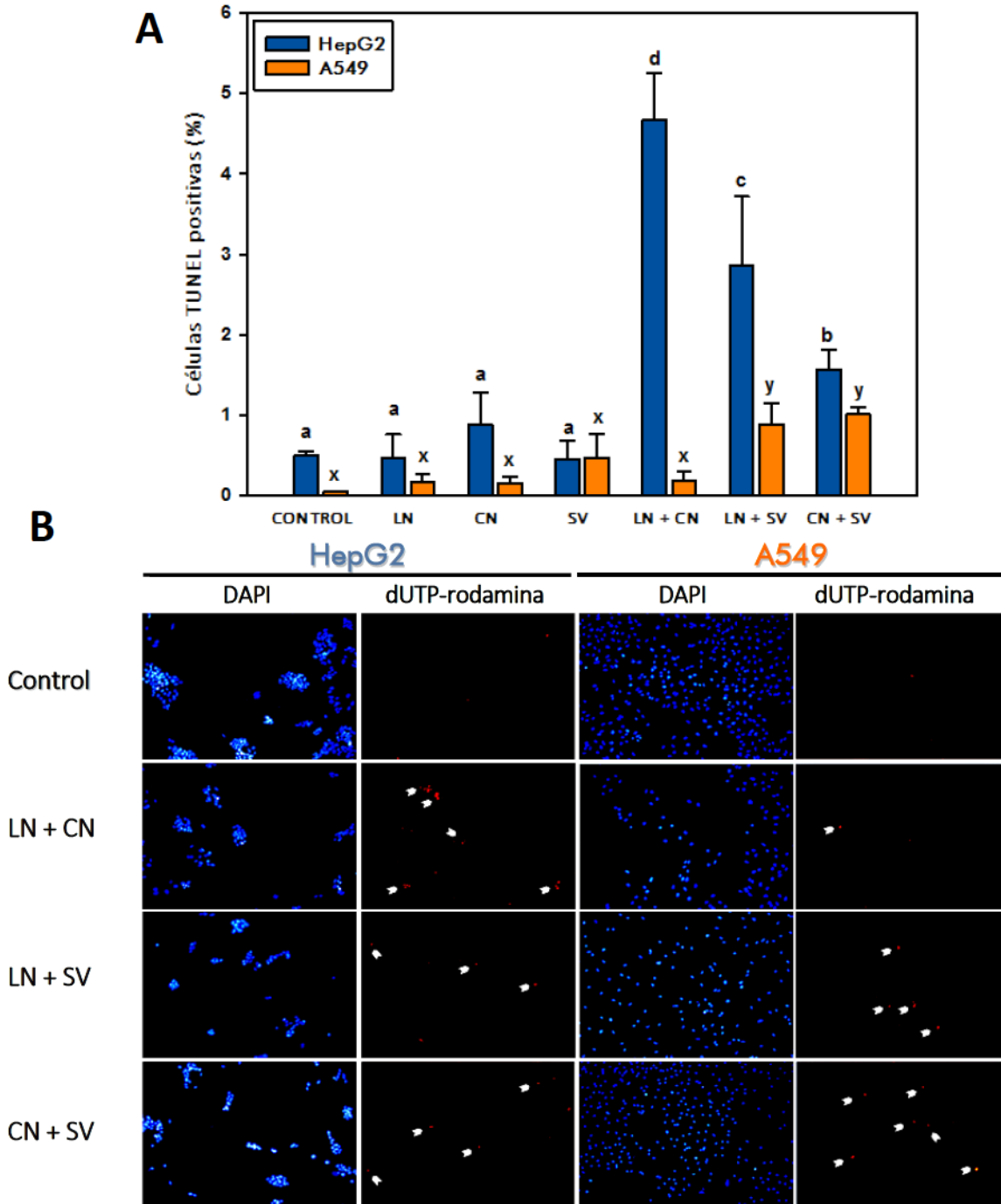


Figura 4.13. Efecto de la combinación de linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre inducción de apoptosis. (A) Proporción de células apoptóticas tratadas con DMSO 0,2% (Control), LN 750 μ M (HepG2) o 550 μ M (A549), CN 3000 μ M (HepG2) o 2500 μ M (A549) y simvastatina 5 μ M (HepG2) o 10 μ M (A549) y sus respectivas combinaciones (LN+CN, LN+SV, CN+SV). Los datos son el promedio \pm DS (n=3); Letras diferentes para HepG2 (a-d) o para A549 (x, y) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. (B) Imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la tinción de los núcleos celulares con DAPI y los núcleos apoptóticos (indicados con flechas) que incorporaron dUTP-rodamina en los controles y los tratamientos LN+CN, LN+SV y CN+SV en células HepG2 y A549.

4.3.3. Análisis del ciclo celular

A los efectos de determinar si la interacción sinérgica antiproliferativa que exhiben las combinaciones de a pares entre los tres compuestos está asociada a un arresto profundo en la progresión del ciclo celular, células A549 se trataron durante 24 horas con LN 1000 μM , CN 4000 μM y SV 10 μM adicionados individualmente y combinados de a pares. Al finalizar los tratamientos, las muestras fueron procesadas y los datos analizados como se mencionó en la sección 3.5.

El análisis de la distribución de las poblaciones evidenció que la SV, al igual que LN y CN, promueve el arresto del ciclo celular en fase G0/G1. Al combinar ambos isoprenoides no se observaron diferencias en la distribución de la población de células en cada una de las fases del ciclo celular respecto de los efectos individuales (Tabla 4.4); mientras que al combinar SV con cada monoterpeno se produjo un efecto aditivo, ya que la presencia de la estatina potenció aún más el marcado arresto en fase G0/G1 promovido tanto por linalool como por 1,8-cineole adicionados individualmente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Efecto de las combinaciones de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre el ciclo celular en células A549

Tratamiento	G0/G1	S	G2/M
Control	57,8 \pm 3,9 ^a	37,5 \pm 1,2 ^a	4,7 \pm 1,5 ^{a,b}
LN 1000 μM	81,3 \pm 1,6 ^c	12,4 \pm 0,1 ^c	6,3 \pm 0,8 ^{a,b}
CN 4000 μM	81,0 \pm 2,5 ^c	12,2 \pm 0,6 ^c	6,8 \pm 0,4 ^b
SV 10 μM	73,5 \pm 3,0 ^b	22,8 \pm 3,6 ^b	3,7 \pm 0,9 ^a
LN + CN	82,4 \pm 1,1 ^c	12,1 \pm 1,4 ^c	5,5 \pm 1,0 ^{a,b}
LN + SV	86,7 \pm 3,8 ^c	9,0 \pm 1,1 ^{c,d}	4,3 \pm 1,3 ^{a,b}
CN + SV	88,7 \pm 2,6 ^c	7,9 \pm 0,5 ^d	3,4 \pm 0,4 ^a

Análisis del ciclo celular en células A549 tratadas durante 24 horas con LN 1000 μM , CN 4000 μM , y SV 10 μM , individualmente o con las combinaciones de a pares. Las fracciones celulares se expresan como porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los datos son el promedio \pm DS (n=3); Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tratamientos para cada fase del ciclo celular.

4.3.4. Efecto de la combinación de linalool y simvastatina sobre la distribución subcelular de Ras

Dado que la SV y los isoprenoides podrían inhibir la prenilación de proteínas a distintos niveles, existe la posibilidad de que la acción combinada entre ellos ejerza un efecto inhibitorio sinérgico sobre la localización en MP de la proteína Ras.

Para evaluar el efecto de la combinación de monoterpenos y simvastatina sobre la distribución subcelular de Ras, células HepG2 se trataron con linalool 750 μM , simvastatina 5 μM o su combinación durante 48 horas y se evaluaron los niveles de Ras en homogenato, y en las fracciones citosólica y de membrana según se describe en el ítem 3.10.2.3.

La cuantificación de las bandas inmunoreactivas obtenidas por Western blot evidenció que los niveles de Ras en la fracción de membrana no se vieron disminuidos de forma significativa para SV 5 μM mientras que el tratamiento con LN 750 μM ocasionó una reducción del 25% de los niveles de la proteína en esta fracción subcelular. Al combinar el monoterpeno con la estatina, esos niveles descendieron hasta un 33%. Al analizar los niveles totales de Ras en homogenato y en la fracción citosólica no se observaron variaciones significativas para ninguno de los tratamientos (Figura 4.14).

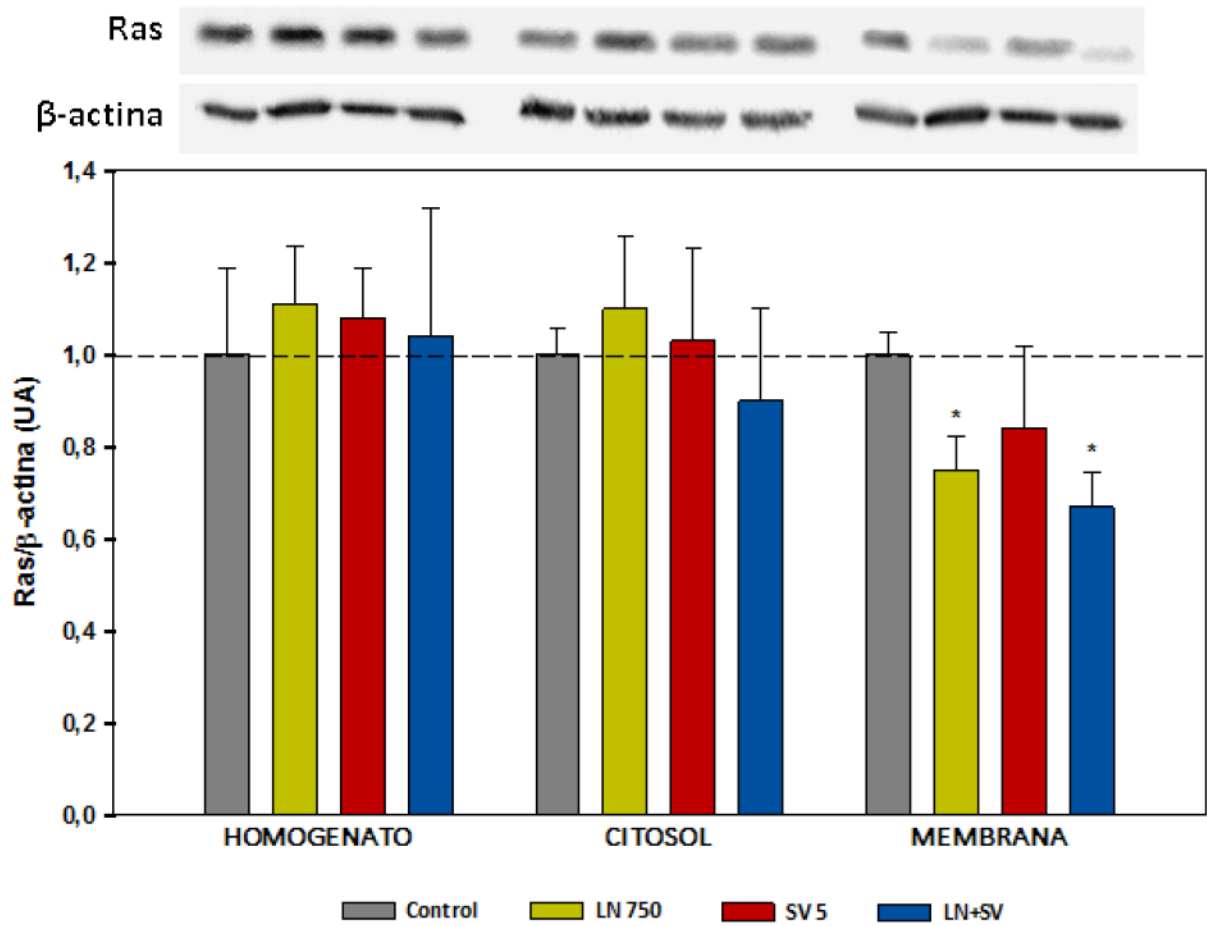


Figura 4.14. Efecto de la combinación de linalool y simvastatina sobre la expresión de los niveles de Ras y su traslocación a membrana en células HepG2. Las células fueron tratadas con DMSO 0,2% (Control), LN 750 μM (LN 750), SV 5 μM (SV 5) y su combinación (LN + SV) durante 48 horas. Se realizaron análisis de Western blot para homogenato celular, fracción citosólica y fracción membrana. Las bandas resultantes fueron cuantificadas por densitometría, utilizando la inmunodetección de β -actina como control de carga de las calles. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA) como la intensidad de la banda de Ras corregida por la correspondiente de β -actina, asignando un valor de 1.0 a los controles. Los datos representan el promedio \pm DS (n=4); *p < 0,05 vs. Control.

4.4. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, si bien el estudio de ambos monoterpenos en diferentes campos es intenso, su actividad como agentes antiproliferativos ha sido poco explorada. Algunos reportes evidencian la actividad antiproliferativa *in vitro* para linalool (Ravizza et al. 2008; Gu et al. 2010) y para 1,8-cineole (Cha et al. 2010; Murata et al. 2013), aunque lo hacen sobre otros modelos celulares.

Tanto linalool como 1,8-cineole fueron efectivos en la inhibición de la viabilidad y proliferación de células HepG2 y A549, lo cual se demostró a partir de tres ensayos diferentes y complementarios como lo son MTT, RN y recuento celular. La diferencia más notable se observó en la efectividad de cada monoterpeno, donde linalool mostró ser el isoprenoide más potente. Para lograr una inhibición de la proliferación del 50% en ambas líneas celulares, se necesitaron concentraciones 4-5 veces mayores de 1,8-cineole respecto de linalool. Por otra parte, los IC50 de cada uno fueron comparables entre las líneas celulares.

La capacidad antiproliferativa de los isoprenoides ha sido atribuida a múltiples efectos sobre la VM como: la inhibición de la actividad de HMGCR (Peffley et al. 2003; Crespo et al. 2013), que produciría una disminución de FPP y GGPP fundamentales para la prenilación de proteínas claves en la proliferación celular; la inhibición de alguna enzima que cataliza la conversión de escualeno y/o lanosterol a colesterol (Ren et al. 1994; Polo et al. 2006), provocando la depleción de este lípido de membrana de muy alta demanda en la proliferación de células tumorales o bien, la inhibición directa de prenil:proteín transferasas como la FTasa y GGTasa (Hardcastle et al. 1999; Mo et al. 2004; Chaudhary et al. 2013).

Por esta razón, en una primera instancia se evaluó si una posible inhibición de la HMGCR por estos monoterpenos es directamente responsable de su efecto antiproliferativo. El agregado de mevalonato, producto de la reacción catalizada por la HMGCR, fue incapaz de revertir la inhibición mediada por linalool y 1,8-cineole en ambas líneas celulares, lo que sugiere que la interferencia con otro/s proceso/s más que la sola inhibición de la HMGCR serían responsables de su actividad antiproliferativa.

Es sabido que, dependiendo del tipo de cáncer, suele prevalecer alguna de las isoformas oncogénicas de Ras. La proteína K-Ras es la más frecuente en cáncer de pulmón (17%), en tanto en HCC predominan K-Ras (7%) y N-Ras (4-5%) (Schubbert et al. 2007; Karnoub et al. 2008; Pylayeva-Gupta et al. 2011). Respecto a las líneas celulares empleadas en esta tesis, ambas presentan proteínas Ras oncogénicas responsables, al menos en parte, de su fenotipo transformado. En células HepG2, se ha descrito una mutación puntual activadora en el codón 61 de N-Ras que provoca el reemplazo de una leucina por glutamina, sustitución que también se ha visto en otros sistemas asociada a una fuerte actividad transformadora (Richards et al. 1990). La línea A549 se caracteriza por una mutación en el codón 12 de K-Ras, que exagera su capacidad oncogénica y está presente en un 30% de los adenocarcinomas estudiados (Slebos et al. 1991; Beau-Faller et al. 2009).

El tratamiento con linalool inhibió la traslocación de Ras a membrana sin alterar los niveles totales de la proteína. Aún más, se observó una acumulación notoria de la proteína en la fracción citosólica (no prenilada) a la concentración máxima ensayada (1500 μ M) durante 48 horas. Esto sugiere que este isoprenoide podría tener un efecto directo sobre la prenilación de Ras impidiendo su anclaje a membrana, como fue evidenciado para otros monoterpenos (Gelb et al. 1995; Hardcastle et al. 1999). La mayor efectividad antiproliferativa del linalool respecto al 1,8-cineole podría estar relacionada con su estructura. Linalool presenta un grupo mono hidroxilado en su esqueleto carbonado, a diferencia del grupo epóxido del 1,8-cineole, que le conferiría la capacidad de inhibir mas potentemente la prenilación de proteínas de 21-26 KDa, entre las cuales se encuentra Ras (Crowell et al. 1994).

Las proteínas Ras oncogénicas promueven la progresión del ciclo celular de manera continua y bloquean señales antiproliferativas a través de varios mecanismos (Ahearn et al. 2012). Básicamente inducen la expresión de factores de transcripción que favorecen la entrada y progresión del ciclo celular (Pylayeva-Gupta et al. 2011). Estos factores actúan promoviendo la síntesis de la ciclina D1 y de la quinasa dependiente de ciclina CDK4, que son fundamentales en el progreso a través de la fase G1 del ciclo celular (Chang et al. 2003; Pylayeva-Gupta et al. 2011). Además, Ras estabiliza la ciclina D1 (a través de la vía PI3K) evitando su degradación (Chang et al. 2003; Yan et al. 2011). De todas formas, la sobreexpresión de ciclina D1 no sería

suficiente para la transformación celular, por lo que se requiere de la cooperación de otro/s oncogén/es. Ras también promueve la progresión del ciclo celular a través de la supresión de inhibidores de las CDK como p21 y p27 (Figura 4. 15) (Anjum et al. 2008; Pylayeva-Gupta et al. 2011).

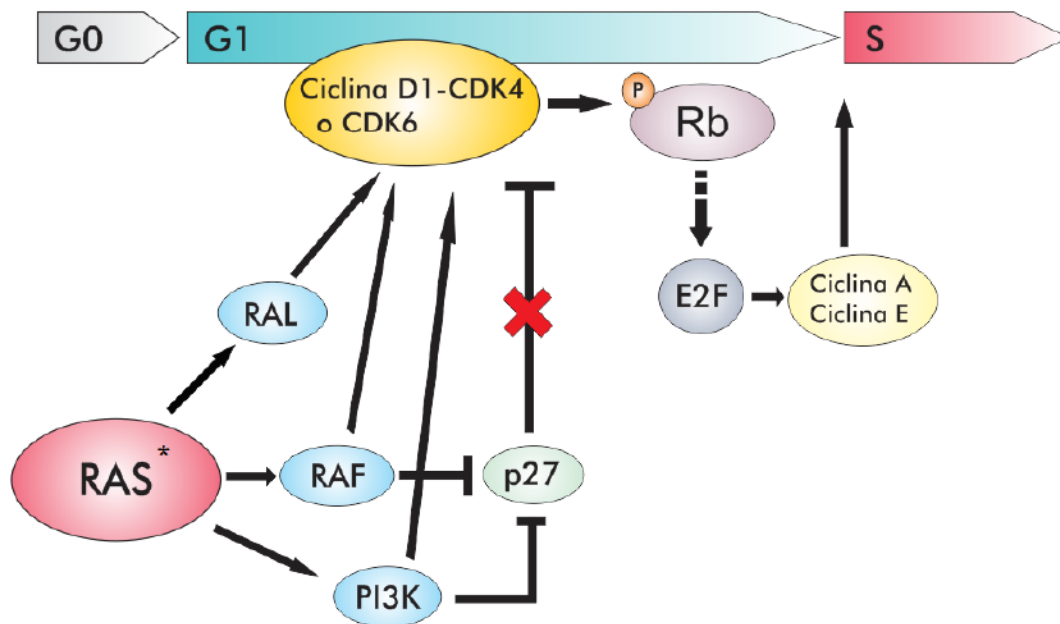


Figura 4.15. Efecto de Ras en la proliferación celular. Ras induce la transcripción del gen de ciclina D1 y suprime p27, un inhibidor de las CDKs. La ciclina D1 se asocia a las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 y promueve la fosforilación de la proteína RB, causando la disociación del complejo que forma con el factor de transcripción E2F (RB-E2F). Una vez liberado, E2F activa varios genes que son necesarios para la progresión del ciclo celular, como las ciclinas A y E, las cuales inducen la transición a través del punto de control G1/S. El asterisco (*) representa una mutación activadora de Ras (Adaptado de Pylayeva-Gupta 2011).

Numerosos trabajos han reportado la capacidad de distintos isoprenoides de arrestar el ciclo celular, principalmente a través de la inhibición o alteración de proteínas clave de vías de señalización de proliferación y supervivencia moduladas por Ras (Bardon et al. 2002; Yuri et al. 2004; Wiseman et al. 2007; Fernandes et al. 2010; Jones et al. 2013).

A concentraciones cercanas al IC50, tanto linalool como 1,8-cineole provocaron un arresto significativo de la población celular en G0/G1 en ambas líneas celulares y

concomitantemente, una disminución de la misma en fase S. Este comportamiento coincide con el reportado para otros isoprenoides, donde generalmente el arresto del ciclo se produce en G0/G1 a partir del efecto producido sobre proteínas involucradas en la transición de la fase G1 a S, como ciclina D1, p21, p27 y p53 entre otras (Bardon et al. 2002; Wiseman et al. 2007). A concentraciones comparables, el efecto citostático observado resultó mucho más potente en células A549, probablemente como consecuencia del menor tiempo de duplicación que presentan respecto de las HepG2. Además, a concentraciones elevadas de 1,8-cineole, las células A549 sufrieron un arresto significativo en G2/M. Este fenómeno se ha descrito en esta misma línea celular para otros monoterpenos, como es el caso del terpinen-4-ol, y para otros compuestos, a los cuales se les atribuye un efecto inhibitorio sobre proteínas de las vías efectoras de Ras (PI3K/Akt) que participan en la transición de G2 a M (Xu et al. 2011; Wu et al. 2012).

Por otra parte, la apoptosis (muerte celular programada) es un mecanismo de defensa crucial en respuesta a diferentes estímulos, muchos de los cuales pueden derivar en la transformación celular. Las moléculas ejecutoras de la apoptosis son las caspasas (cistein-aspártato proteasas), cuya naturaleza difiere dependiendo de la vía apoptótica activada (intrínseca o extrínseca). En una etapa avanzada de la cascada apoptótica, ambas vías convergen en la caspasa-3 efectora. Existe una maquinaria molecular compleja que regula positiva y negativamente la apoptosis. Dicha maquinaria se encuentra balanceada en condiciones normales pero en células tumorales suele desregularse (Pylayeva-Gupta et al. 2011).

La actividad de Ras oncogénica promueve la activación de mediadores anti-apoptóticos y la inhibición de proteínas pro-apoptóticas, provocando un desbalance que favorece la inhibición de la apoptosis y por ende, la continua división celular (Cox et al. 2003; Chang et al. 2003; Palozza et al. 2010; Pylayeva-Gupta et al. 2011).

Recientemente se han publicado trabajos que describen la capacidad de ciertos isoprenoides naturales de inducir apoptosis en modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*, principalmente a partir de la modulación de vías efectoras de Ras (Arunasree 2010; Chaudhary et al. 2012; Kim et al. 2012; Chaudhary et al. 2013; Jia et al. 2013; Liu et al. 2013).

Por esta razón, se evaluó si linalool y 1,8-cineole ejercían su actividad antiproliferativa a través de la inducción de apoptosis. En una primera instancia no fue posible identificar, mediante la determinación de caspasa-3 por ensayos de Western blot, la participación de este mecanismo para ninguno de los dos tipos celulares. Esta circunstancia podría deberse a una o varias razones: o bien estos compuestos no indujeron apoptosis o bien lo hicieron a niveles moderados y los métodos, concentraciones y/o tiempos ensayados para la detección de caspasa-3 por esta metodología no fueron adecuados. Por otro lado, cuando ambas líneas celulares fueron expuestas a concentraciones elevadas de DMSO se evidenció la presencia de las bandas correspondientes a la enzima, siendo las células HepG2 más sensibles a dicho tratamiento.

En un segundo experimento, se procedió a emplear un ensayo de mayor sensibilidad que permitiera detectar la actividad de esta enzima efectora de la apoptosis. Para ello, se realizaron los ensayos de actividad en células HepG2. Estos estudios arrojaron dos resultados interesantes. Solo a tiempos cortos (12 horas) 1,8-cineole tuvo efecto sobre la actividad de caspasa-3, aunque no estimulando su actividad sino por el contrario provocando una disminución significativa de la misma. El otro hecho relevante y de mayor interés en este contexto fue que linalool, en condiciones donde inhibe un 50% la proliferación celular (1500 μ M, 48 horas de tratamiento), indujo significativamente la actividad enzimática de esta caspasa efectora entre 2 y 3 veces por encima de las células control.

Para confirmar los resultados obtenidos y ampliar las condiciones de estudio, se determinó apoptosis por el ensayo de TUNEL en ambas líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos durante 48 horas. Los resultados obtenidos ratifican dos de los fenómenos anteriormente observados. Por un lado, linalool indujo apoptosis de manera significativa en células HepG2 en las mismas condiciones que las observadas para los ensayos de caspasa-3, sin observarse efecto alguno por parte de 1,8-cineole en iguales circunstancias. Por otra parte, en condiciones donde ambos monoterpenos promueven un 50% de inhibición de la proliferación de células A549, ninguno de ellos fue capaz de inducir apoptosis. Esto sugiere que el principal mecanismo antiproliferativo es un profundo efecto citostático, con arresto del ciclo celular principalmente en G0/G1.

A concentraciones de ambos isoprenoides próximas al doble de su IC50, prácticamente la totalidad de las células hepáticas resultaron apoptóticas. Mientras que en la línea pulmonar únicamente se observó el mismo efecto para el 1,8-cineole, ya que el linalool sólo provocó un aumento moderado de la apoptosis.

La interpretación de los resultados presentados hasta el momento sugiere que ambas actividades, citostáticas y citotóxicas, pueden participar del efecto antiproliferativo de cada uno de estos isoprenoides. Ello dependerá de la naturaleza de cada monoterpeno, los tiempos de acción, las concentraciones ensayadas y principalmente de la línea celular estudiada. En el contexto de los experimentos llevados a cabo en esta tesis, las células A549 presentan una mayor tendencia a permanecer arrestadas G0/G1 y menor sensibilidad a sufrir apoptosis que las células HepG2. Asimismo no debería descartarse que otros mecanismos adicionales a los mencionados pudieran estar participando del efecto inhibitorio producido por linalool y 1,8-cineole, como la muerte celular por autofagia (Shen et al. 2011), la cual ha sido descrita para ciertos monoterpenos y productos naturales (Lin et al. 2007; Kim et al. 2012).

La combinación de los monoterpenos a dosis sub-efectivas ($\frac{1}{2}$ IC50) evidenció una sustancial interacción sinérgica antiproliferativa, con valores de $R > 1$ para los tres métodos empleados (MTT, RN y recuento celular) tanto en las células de HCC como en las de adenocarcinoma pulmonar. El sinergismo observado fue confirmado a partir de tratamientos adicionales donde se implementaron otras combinaciones a diferentes concentraciones de cada monoterpeno, obteniéndose valores de R muy superiores a 1 en todos los casos. Este comportamiento podría explicar, al menos en parte, por qué ciertos aceites esenciales resultan inhibidores más potentes que sus componentes principales individualmente, como lo han descrito Doll-Boscardin y Li (Li et al. 2009b; Doll-Boscardin et al. 2012) y nuestro grupo de trabajo donde el aceite esencial de mandarina presenta actividad antiproliferativa más efectiva que el limoneno (su principal componente) en células HepG2 y A549 (Manassero et al. 2013).

El análisis por citometría de flujo en células A549 prácticamente no mostró variaciones entre el efecto individual de cada isoprenoide y la combinación de ambos. Esto podría deberse a que las concentraciones utilizadas en los tratamientos individuales promovieron un arresto muy

marcado en fase G0/G1, de modo que de existir un efecto aditivo/sinérgico para la combinación, es posible que resulte difícil apreciarlo.

La acción combinada de linalool y 1,8-cineole promovió la inducción de apoptosis de manera significativa y sinérgica solo en células HepG2, mientras que en la línea A549 el tratamiento combinado no resultó diferente de los tratamientos individuales ni de los controles. Este resultado es consistente con los antes mencionados, donde claramente las células HepG2 presentan mayor predisposición a sufrir apoptosis.

Numerosos estudios han demostrado que las estatinas son capaces de inhibir la proliferación de una amplia variedad de células tumorales incluyendo de carcinoma pancreático, gástrico y prostático, adenocarcinoma de colon, de pulmón, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma y leucemia mieloide aguda, cáncer hepático y de mama entre tantas otras (Hindler et al. 2006; Sassano et al. 2007; Pisanti et al. 2014). Diferentes líneas de evidencia sugieren que las estatinas inhiben la progresión del ciclo celular mediante la inducción de la expresión de las proteínas p21 y p27 y/o la represión de factores proliferativos como las ciclinas y CDKs (Maksimova et al. 2008; Relja et al. 2010; Pisanti et al. 2014). También se ha visto que promueven la apoptosis atenuando la actividad de Ras y RhoA y sus vías efectoras, principalmente a causa de la depleción del GGPP y en menor medida de FPP (Osmak 2012; Chen et al. 2013; Pisanti et al. 2014). Otros trabajos reportan que las estatinas podrían tener un efecto benéfico en la disminución del riesgo de desarrollar HCC y cáncer de pulmón entre otros, en el mejoramiento de la supervivencia de pacientes con HCC (en tratamientos asociados a otras drogas terapéuticas) y en la reducción de la recurrencia de ciertos tipos de cáncer (Khurana et al. 2007; El-Serag et al. 2009; Ahern et al. 2011; Singh et al. 2013).

En particular, se ha descrito que la simvastatina inhibe la proliferación de células tumorales en el rango de concentraciones que aquí describimos (Campbell et al. 2006; Goc et al. 2012; Kah et al. 2012). En las condiciones experimentales estudiadas, simvastatina inhibe en un 50% la proliferación de ambas líneas celulares a concentraciones cercanas a 20 μ M.

Teniendo en cuenta que las dosis máximas de simvastatina utilizadas en el tratamiento de hipercolesterolemia han sido asociadas a múltiples efectos tóxicos (Bonetti et al. 2003;

Pisanti et al. 2014; Pastori et al. 2015) y que las estatinas utilizadas como agentes quimioterapéuticos únicos exhiben propiedades anticancerígenas modestas (Konstantinopoulos et al. 2007; Osmak 2012), se considera su potencial uso en el tratamiento del cáncer principalmente en combinación con otras sustancias quimioterapéuticas (Hindler et al. 2006; Osmak 2012; Pisanti et al. 2014). Por tal motivo, se planteó estudiar la combinación de simvastatina con linalool y 1,8-cineole en busca de posibles efectos sinérgicos que permitan aumentar su efectividad y/o disminuir las concentraciones de estatinas empleadas.

Se combinaron concentraciones sub-efectivas de simvastatina con cada isoprenoide a $\frac{1}{2}$ IC50 y la viabilidad y proliferación celular en ambas líneas celulares se determinó por los ensayos de MTT, RN y RC. En todos los casos, las combinaciones resultaron siempre en un efecto sinérgico ($R > 1$). Del mismo modo, otras combinaciones de los monoterpenos con simvastatina a diferentes concentraciones resultaron en gran medida en valores de R muy por encima de 1, confirmando la interacción sinérgica.

La combinación entre linalool y simvastatina provocó un efecto inhibitorio aditivo sobre la traslocación de Ras a membrana en células HepG2, sin modificar los niveles totales de la proteína. En función de las hipótesis planteadas sobre los mecanismos de acción de isoprenoides y estatinas mencionadas anteriormente, el hecho de que dicha combinación no resultara sinérgica podría deberse a que las concentraciones empleadas no fueran las ideales para evidenciarlo. También podría ser que la depleción del pool de FPP/GGPP producida por la estatina, responsable de su efecto inhibitorio sobre Ras, esté parcialmente compensada por la acumulación de dichos intermediarios a partir de la acción inhibitoria del linalool en las etapas finales de la VM (se verá en detalle en el capítulo 5), atenuando el aporte inhibitorio de la estatina para la combinación.

Al evaluar apoptosis por el método de TUNEL para las combinaciones entre simvastatina con cada monoterpeno, se produjo una inducción significativa de la misma en ambas líneas celulares. El efecto resultó más pronunciado en células HepG2, particularmente para la combinación entre linalool y simvastatina. Varios son los mecanismos que ambos compuestos podrían estar afectando para favorecer este tipo de comportamiento sinérgico, como por

ejemplo la acción potenciada sobre la inhibición de la traslocación de Ras a membrana recientemente descrita.

Cuando células A549 fueron tratadas conjuntamente con simvastatina y cada uno de los isoprenoides, el arresto de la población celular en G0/G1 se profundizó, aunque solo de manera significativa respecto al tratamiento individual con la estatina.

Independientemente de los mecanismos que participan y que se potencian en menor o mayor medida para las distintas combinaciones, es evidente que la utilización conjunta de estos compuestos potencia su actividad antiproliferativa individual. Estos resultados alientan la propuesta de utilizar las estatinas combinadas con otros compuestos capaces de inhibir la proliferación de celular malignas, como los monoterpenos e isoprenoides naturales en general.

Capítulo 5

**EFFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE
SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO:
MECANISMOS DE ACCIÓN
Y SU COMBINACIÓN CON
SIMVASTATINA**

Este capítulo está dedicado al estudio de la acción de ambos isoprenoides sobre el metabolismo lipídico en general, con especial atención en la vía del mevalonato. Los experimentos llevados a cabo se desarrollaron fundamentalmente en células HepG2 como modelo de células hepáticas, por ser éstas de fundamental importancia en la regulación del metabolismo lipídico en mamíferos y el principal blanco de las terapias hipolipemiantes con estatinas.

5.1. EFECTOS DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE LA VÍA DEL MEVALONATO

5.1.1. Incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables

Con el objetivo de evaluar el efecto de cada isoprenoide sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos importantes de la VM, se trató a ambas líneas celulares durante 48 horas con concentraciones crecientes de cada monoterpeno -ninguna de las cuales afecta la viabilidad celular- y se adicionó ^{14}C -acetato durante las últimas 3 horas de tratamiento. Los lípidos insaponificables radiactivos extraídos según lo descrito en la sección 3.8.1 se separaron por TLC y se revelaron por autorradiografía. Se identificó el colesterol y otros lípidos de la VM (lanosterol, ubiquinona, dolicol y escualeno) por comparación con una mezcla de estándares resuelta en la misma placa y se cuantificó la radiactividad incorporada en ellos por densitometría (Figura 5.1, panel A). Se analizó el efecto de los tratamientos sobre la incorporación neta de ^{14}C -acetato en las especies lipídicas antes mencionadas, la cual depende de la acción de los monoterpenos tanto sobre la HMGCR como en etapas posteriores de la vía. Se evaluó además la distribución porcentual de ^{14}C en cada especie lipídica del insaponificable (distribución relativa). A partir de ello se calcularon las relaciones intermediario/colesterol y ubiquinona/colesterol para cada concentración empleada, lo que permitió evidenciar el efecto específico de estos isoprenoides sobre las etapas de la VM posteriores a catalizada por la reductasa.

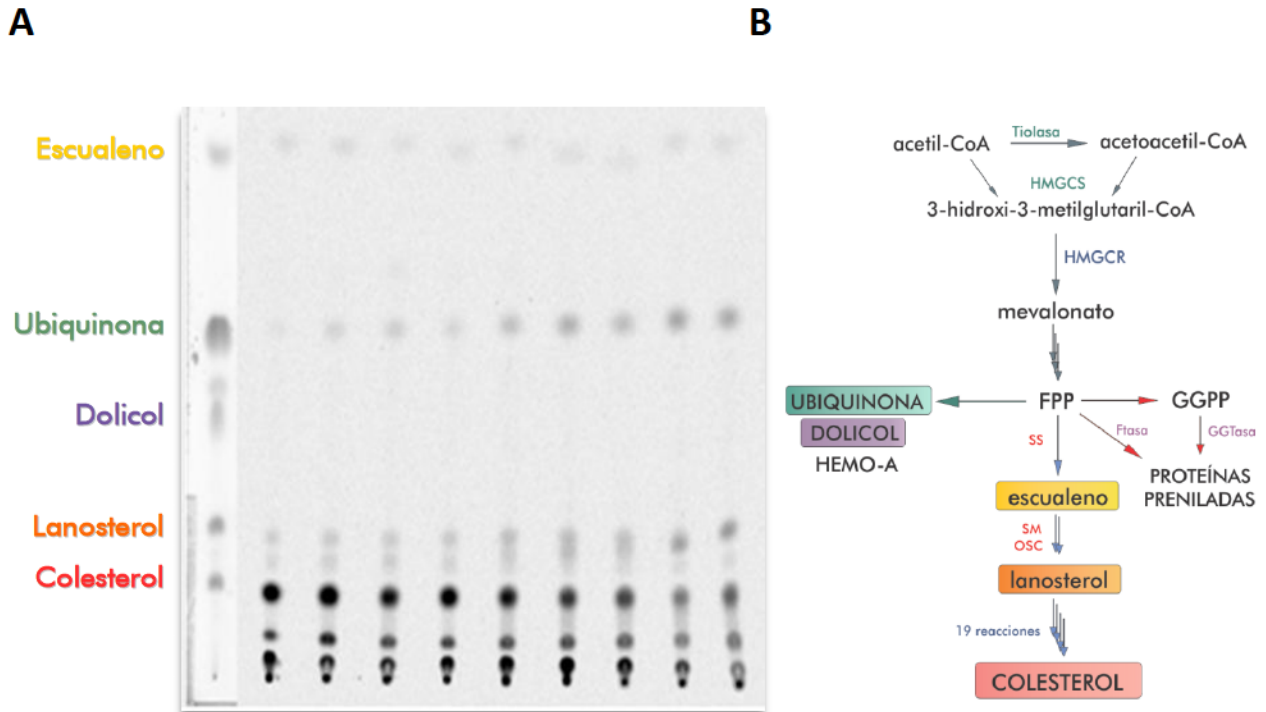


Figura 5.1. Incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables separados mediante TLC y revelados por autorradiografía. Finalizada la separación de los lípidos insaponificables, las placas fueron expuestas sobre una pantalla Storage Phosphor Screen y reveladas en un escáner Storm 840 (A). El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el software Image J y las clases lipídicas presentes se identificaron por comparación con una mezcla de estándares desarrollada en la misma TLC. En todos los casos, los resultados se normalizaron con los respectivos niveles de PCT para cada muestra. (B) Esquema simplificado de la VM destacando los lípidos insaponificables identificados.

La incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol disminuyó significativamente por efecto de los tratamientos con LN y CN a partir de $100 \mu\text{M}$ y $250 \mu\text{M}$ en células HepG2 (Figura 5.2, paneles A y B) y de $200 \mu\text{M}$ y $250 \mu\text{M}$ en células A549 (Figura 5.3, paneles A y B) respectivamente. Se construyeron curvas de inhibición de la incorporación de acetato en colesterol en función de la concentración y por regresión no lineal se calcularon los valores de $\text{IC}_{50\text{sc}}$ que se muestran en los paneles A y B de las figuras 5.2 y 5.3.

Al analizar la incorporación de ^{14}C -acetato en otros lípidos insaponificables de la VM, pudo detectarse y cuantificarse radiactividad incorporada en escualeno, lanosterol y ubiquinona en células HepG2, mientras que en las células A549 solo fue posible detectar lanosterol en todos los casos.

El tratamiento de células HepG2 con concentraciones de LN entre 200 y 600 μM (entre las cuales se encuentra la $\text{IC}_{50\text{sc}}$) ocasionó un aumento paulatino de la marca radiactiva en lanosterol y ubiquinona, sin evidenciarse cambios en escualeno. La incorporación de acetato en el total de los lípidos insaponificables (LIT) decayó radicalmente cuando las células se trataron con 800 μM de LN, la máxima concentración ensayada. A pesar de ello, se mantuvieron los niveles elevados de ^{14}C -acetato incorporado en lanosterol y ubiquinona (Figura 5.2, panel A). A esta concentración se produjo además un aumento significativo de la relación escualeno/colesterol (Figura 5.2, panel C).

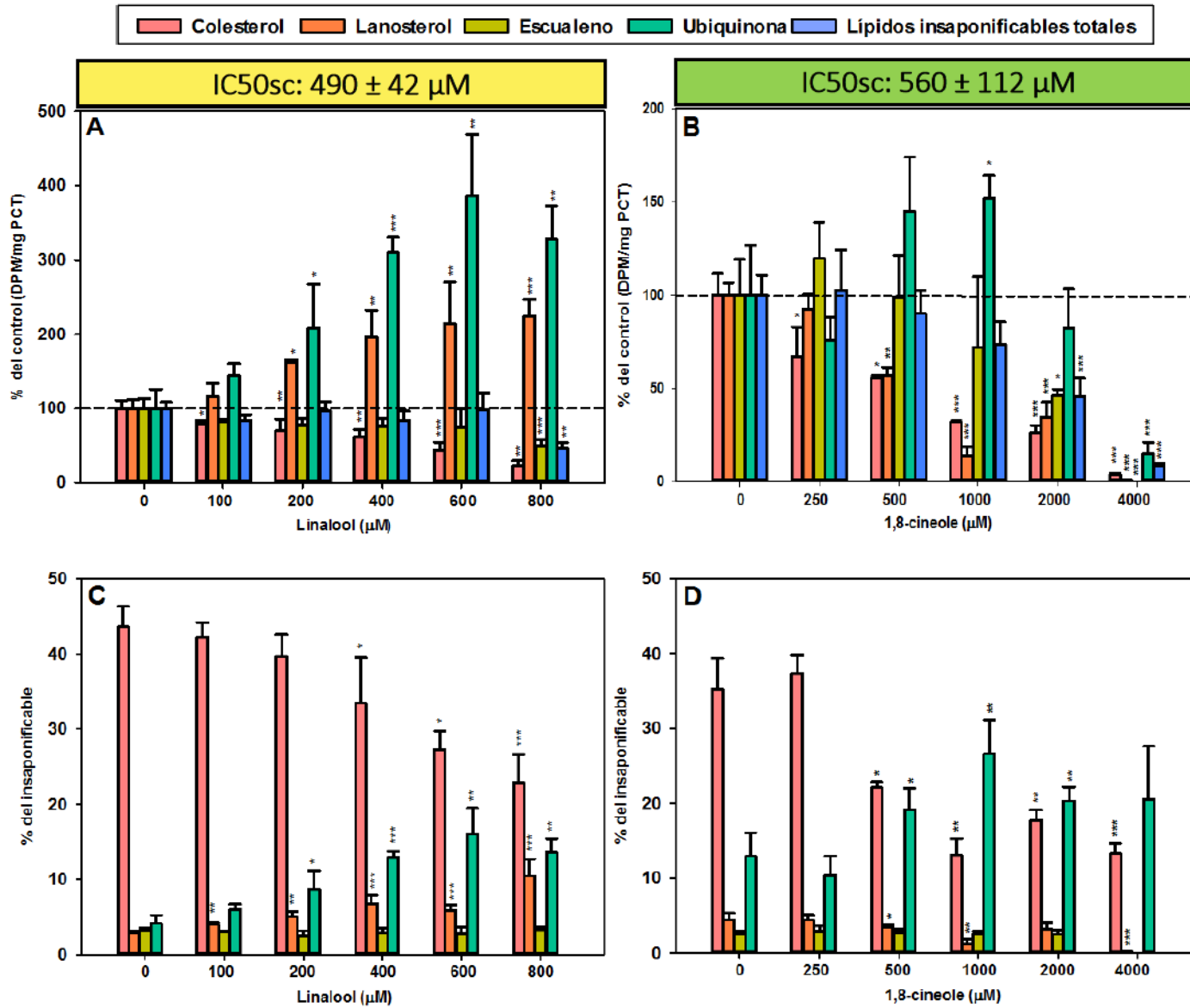
A diferencia de lo observado para linalool, al tratar las células HepG2 con 1,8-cineole a concentraciones que inhiben entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ la síntesis endógena de colesterol (500-1000 μM), se evidenció una disminución de la marca radiactiva no solo en colesterol sino también en lanosterol, mientras que los niveles de ^{14}C -ubiquinona aumentaron considerablemente, sin apreciarse cambios en escualeno. A concentraciones mayores (2000 μM) la incorporación de acetato en lanosterol, escualeno, ubiquinona y LIT descendió notablemente hasta caer drásticamente cuando se trató a las células con 4000 μM de CN, concentración que inhibe la colesterogénesis por encima del 90% (Figura 5.2, panel C).

La acción de cada monoterpeno sobre las etapas finales de la colesterogénesis en células HepG2 se pone claramente en evidencia al analizar la relación de los intermediarios respecto al colesterol. Para los tratamientos con 1,8-cineole la relación escualeno/colesterol aumentó significativamente hasta aproximadamente un 300% entre 250 y 2000 μM , en tanto que el cociente lanosterol/colesterol se mantuvo invariable en el rango de concentraciones antes mencionado (Figura 5.2, panel D). Por el contrario, para los tratamientos con linalool la relación escualeno/colesterol solo se modificó a la máxima concentración mientras que a partir de 200 μM ya se advirtió un incremento en la razón lanosterol/colesterol (Figura 5.2, panel C).

En células A549 tratadas con linalool, la incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol disminuyó en mayor proporción que para LIT (Figura 5.3, panel A), lo que sugiere una redistribución de la marca en otros intermediarios y/o productos de la VM. La radiactividad incorporada en lanosterol se mantuvo invariable en tratamientos con concentraciones menores o iguales a 500 μM de LN, mientras que con la máxima concentración ensayada (700 μM) se

redujo significativamente (Figura 5.3, panel A). Sin embargo se registró una acumulación relativa de la incorporación de acetato en este intermediario a partir de 200 μM que se sostuvo aun a 700 μM (Figura 5.3, panel B).

El tratamiento de células A549 con 1,8-cineole provocó, junto con la inhibición profunda de la colesterogénesis, una disminución significativa en la incorporación de acetato en lanosterol a partir de la concentración más baja ensayada (250 μM) y en LIT a partir de 500 μM (Figura 5.3, panel C). A diferencia de lo observado en las células hepáticas, 1,8-cineole indujo un aumento significativo de la relación lanosterol/colesterol (Figura 5.2, panel D).



Lan/col	1,00	1,43 ^c	1,90 ^c	3,05 ^c	3,20 ^c	6,90 ^c
Esc/col	1,00	1,01	0,90	1,21	1,40	2,02 ^c
Ubq/col	1,00	1,48 ^a	2,29 ^b	4,04 ^c	6,16 ^b	6,24 ^c
	1,00	0,72	1,20	0,94	1,41	0,10 ^c
	1,00	1,13 ^a	1,75 ^c	2,78 ^c	1,99 ^c	ND
	1,00	0,76	2,38 ^a	5,58 ^c	3,15 ^b	4,26 ^c

Figura 5.2. Incorporación de ¹⁴C-acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células se trataron con concentraciones crecientes de los monoterpenos que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando 2 μCi/ml de ¹⁴C-acetato durante las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en colesterol, lanosterol, escualeno, ubiquinona y LIT para los tratamientos con LN (A) y CN (B) se reveló por autorradiografía y cuantificó por densitometría. Dolicol no fue detectado en ningún caso. Las IC50sc se obtuvieron a partir de curvas de regresión no lineal. Los paneles C y D muestran la incorporación porcentual de marca radiactiva en cada especie lipídica respecto del total del insaponificable. Los resultados se expresan como el promedio ± DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. La relación lanosterol/colesterol (Lan/col), escualeno/colesterol (Esc/col) y ubiquinona/colesterol (Ubq/col) se expresa en unidades arbitrarias asumiendo un valor de 1,0 para las células control. (a) p < 0,05; (b) p < 0,01; (c) p < 0,001.

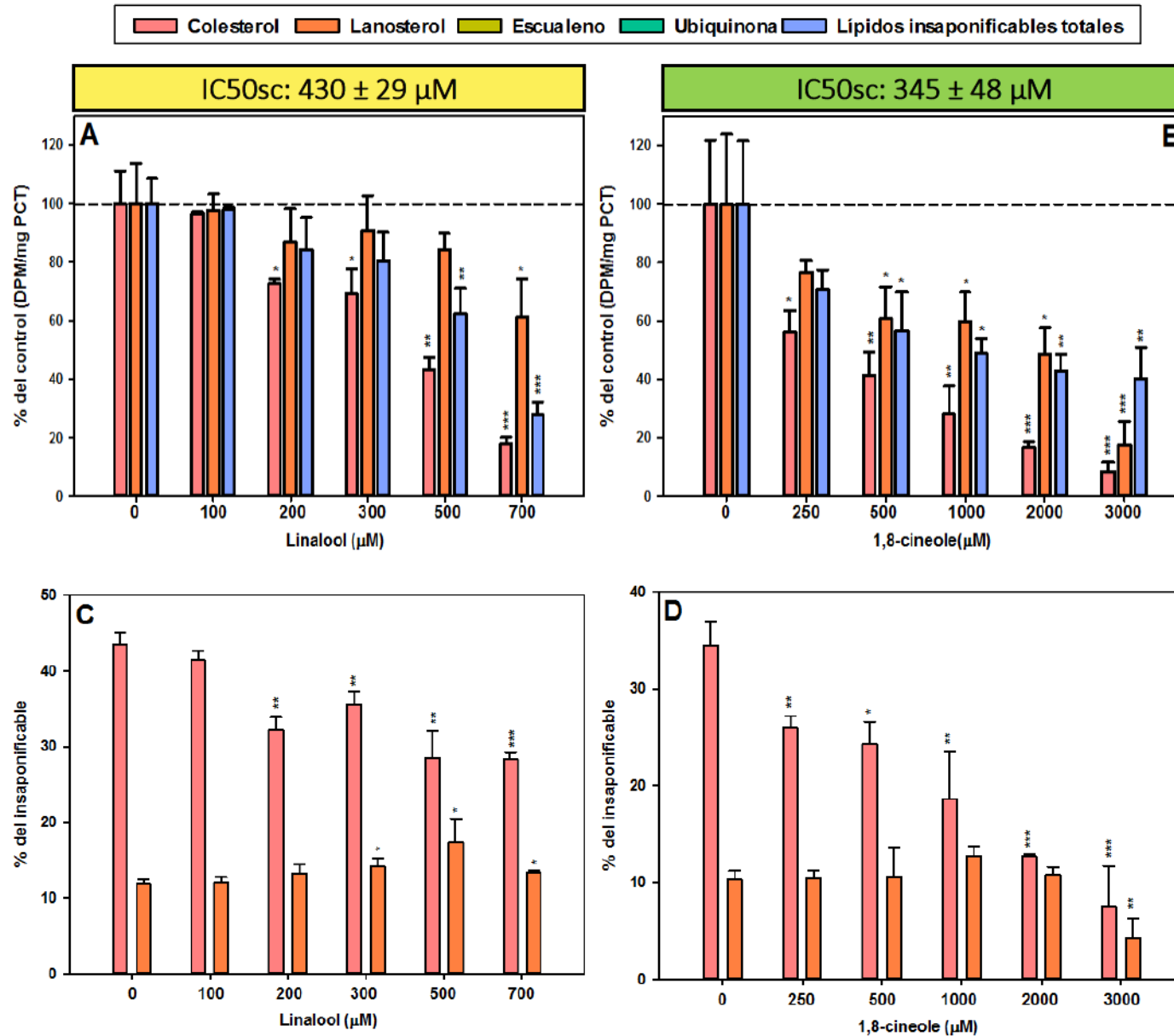


Figura 5.3. Incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de células A549 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células se trataron con concentraciones crecientes de los monoterpenos que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -acetato durante las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en colesterol, lanosterol y LIT para los tratamientos con LN (A) y CN (B) se reveló por autorradiografía y cuantificó por densitometría. Dolicol no fue detectado en ningún caso. Las IC50sc se obtuvieron a partir de curvas de regresión no lineal. Los paneles C y D muestran la incorporación porcentual de marca radiactiva en cada especie lipídica respecto del total del insaponificable. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. La relación lanosterol/colesterol (Lan/col) se expresa en unidades arbitrarias asumiendo un valor de 1,0 para las células control. (a) p < 0,05; (b) p < 0,01; (c) p < 0,001.

Lan/col	1,00	1,06	1,51 ^c	1,45 ^c	2,22 ^c	1,73 ^c	1,00	1,35 ^c	1,45 ^a	2,28 ^c	2,84 ^c	1,90 ^b
---------	------	------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Además de colesterol, lanosterol, ubiquinona y escualeno, se detectó y cuantificó la incorporación de ^{14}C -acetato en otros lípidos insaponificables. Si bien no es posible afirmarlo, ya que no contamos con estándares comerciales que ayuden a su identificación, es probable que dichas bandas radiactivas correspondan a intermediarios esteroideos de la VM comprometidos a la síntesis de colesterol, o bien a oxisteroles producidos a partir de reacciones derivadas de la VM. En todos los casos se detectaron al menos 3 y hasta 4 manchas a las que se denominaron lípidos W, X, Y y Z, en función de su relación de avance (Rf), para las cuales $R_f(Z) > R_f(Y) > R_f(X) > R_f(W)$ (Figura 5.4, panel A).

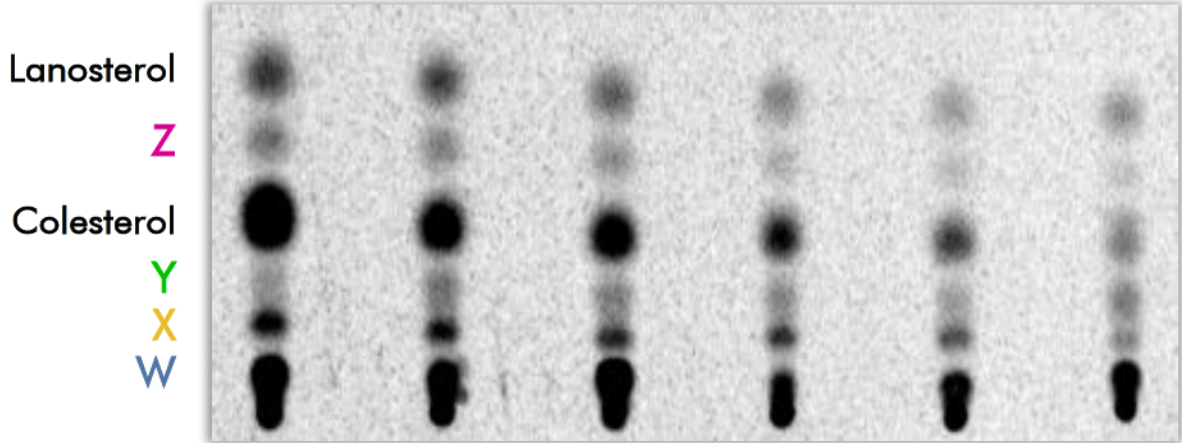
En base a distintos trabajos publicados que emplean técnicas y metodologías comparables a las aquí presentadas (Shefer et al. 1995; Rowe et al. 2003; Wong et al. 2007; Yamauchi et al. 2007; Marco et al. 2009; Zerenturk et al. 2012) es posible suponer que el lípido “W” correspondería a 7-dehidrocolesterol (7-DHC), último intermediario de la vía de Kandutsch-Russell que es convertido a colesterol por acción de la enzima DHCR7. La banda identificada como lípido “Y” podría ser desmosterol y/o 24(S), 25-epoxicolesterol (24,25-EC). El primero es un intermediario propio de la vía de Bloch que se convierte en colesterol en una reacción catalizada por la enzima DHCR24. El segundo es un oxisterol sintetizado de forma paralela al colesterol en una reacción derivada de la VM donde el 2,3;22,23-diepoxiescualeno (DOS) es convertido a 24(S),25-epoxilanoesterol a partir de la actividad la enzima 2,3-oxidoesqualeno:lanosterol ciclasa (OSC). Esta enzima también es la encargada de convertir el 2,3-monoepoxiescualeno (MOS) en lanosterol. Por otra parte, el lípido “Z” sería lathosterol, esterol de 27 carbonos que es convertido a 7-dehidrocolesterol por acción de la enzima lathosterol oxidasa. Para el lípido “X” no se encontró suficiente evidencia en función de su Rf que permita asociarlo a algún intermediario en particular. En la figura 5.4 se representan las vías descritas para la síntesis de colesterol y de 24,25-EC en las que participan los intermediarios y productos mencionados.

Dado que su análisis podría contribuir al entendimiento de las posibles etapas moduladas por cada isoprenoide sobre las reacciones finales de la colesterogénesis, se determinó el efecto de los tratamientos sobre la distribución porcentual de cada especie en LIT y la relación de cada intermediario respecto del colesterol.

El tratamiento con LN ocasionó un incremento de la incorporación relativa de acetato en el lípido W (7-dehidrocolesterol) de ambas líneas celulares cuando las concentraciones utilizadas fueron elevadas. Se observó un incremento de la radiactividad relativa incorporada en el lípido Z (lathosterol) con concentraciones de 500 μM de LN en células A549 y a partir de 100 μM en células HepG2. La fracción de la incorporación de acetato en el insaponificable correspondiente al lípido X se mantuvo invariable en los distintos tratamientos con LN, no obstante la relación X/colesterol se incrementó entre un 40 y 70% en ambas líneas celulares cuando se utilizaron concentraciones intermedias y elevadas de este monoterpeno (Figura 5.5, paneles A y B). Por otra parte, la incorporación de acetato en el lípido Y no pudo ser detectada en todos los casos.

A diferencia de linalool, 1,8-cineole indujo la acumulación de la radiactividad incorporada en el lípido Y en cantidades suficientes para poder ser detectada en todos los tratamientos. Por otra parte, el comportamiento de este monoterpeno en cada línea celular presentó algunas diferencias. En las células hepáticas a concentraciones bajas (250 μM) produjo un aumento neto de la radiactividad incorporada en el lípido Y (desmosterol/24,25-EC), y una disminución en el lípido Z (lathosterol) que se revirtió a concentraciones entre 1000-2000 μM . A 4000 μM se produjo una depleción completa del acetato incorporado en estos intermediarios excepto para la especie W (7-dehidrocolesterol) en donde se acumuló fuertemente. En todos los casos, la relación intermediario/colesterol se vio incrementada entre 500 y 2000 μM (Figura 5.5, panel C). En las células pulmonares se observó un incremento muy marcado de la proporción de la marca incorporada en el lípido Y (desmosterol/24,25-EC) a partir de 500 μM que se sostuvo hasta la máxima concentración ensayada, condición en la que también se apreció una leve pero significativa acumulación de radiactividad en el lípido Z (lathosterol) (Figura 5.5, panel D).

A



B

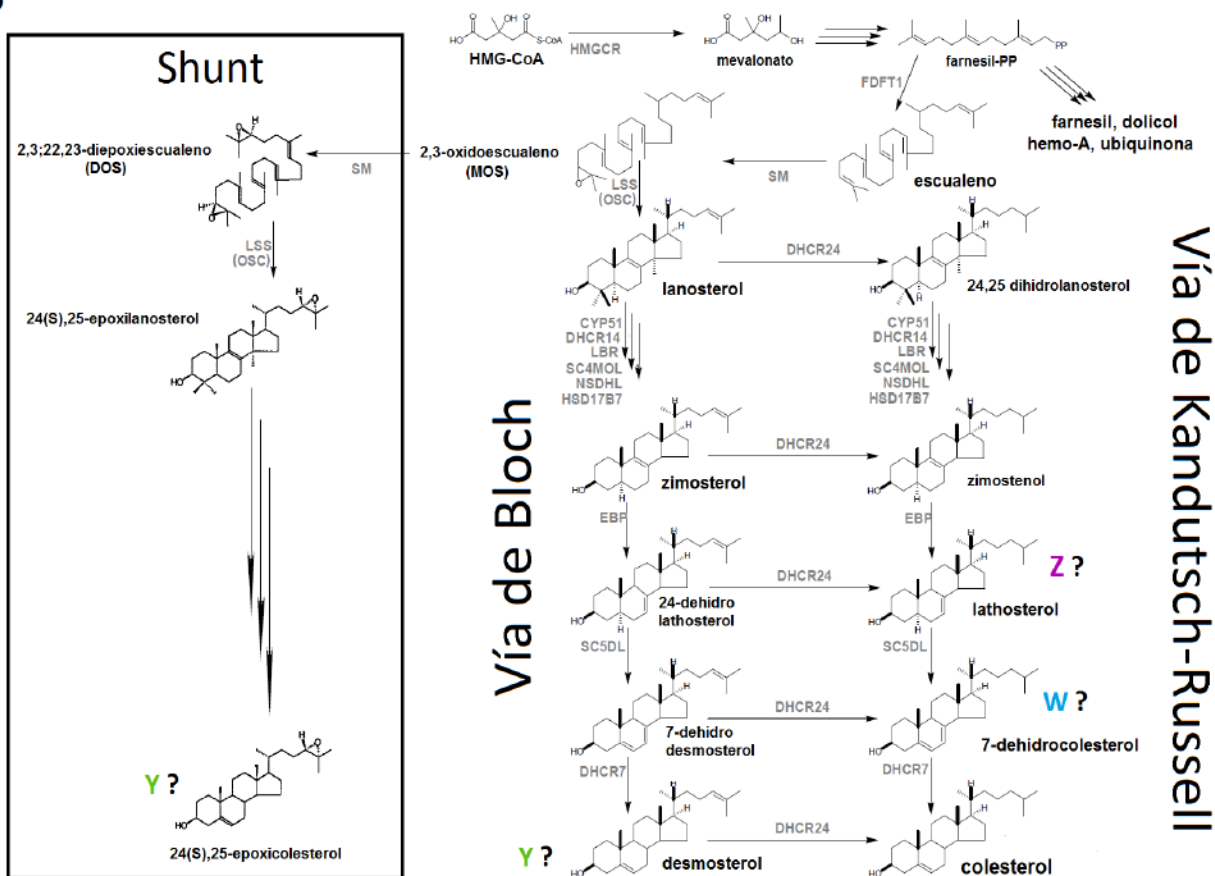


Figura 5.4. Lípidos insaponificables no identificados de la vía del mevalonato. (A) Ubicación relativa de los lípidos W, X, Y y Z al separar LI radiactivos según lo descrito en la sección 3.8.1. (B) Esquema que representa las vías de Bloch y Kandutsch-Russell para la síntesis de colesterol, y la vía derivada (Shunt) de síntesis de 24(S),25 epoxicolesterol a partir de 2,3-oxidosqualeno, donde se señalan las posibles identidades para los lípidos W, Y y Z (Adaptado de Ačimovič 2013).

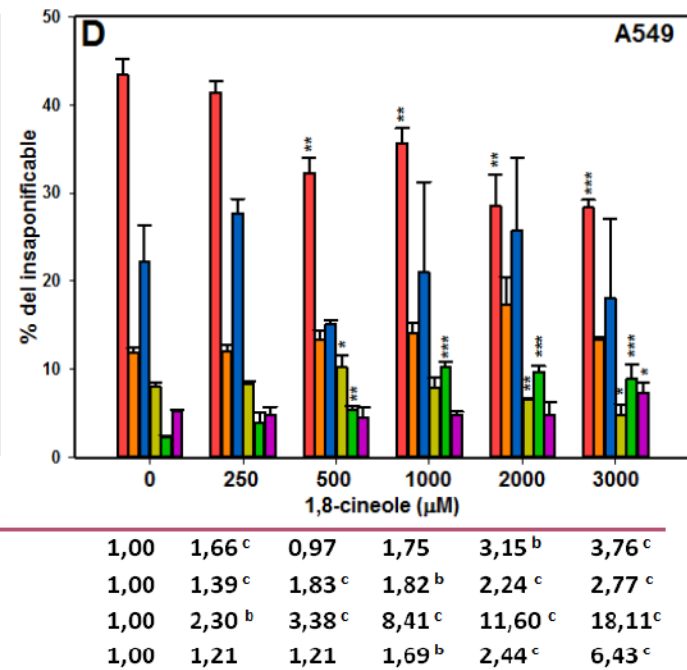
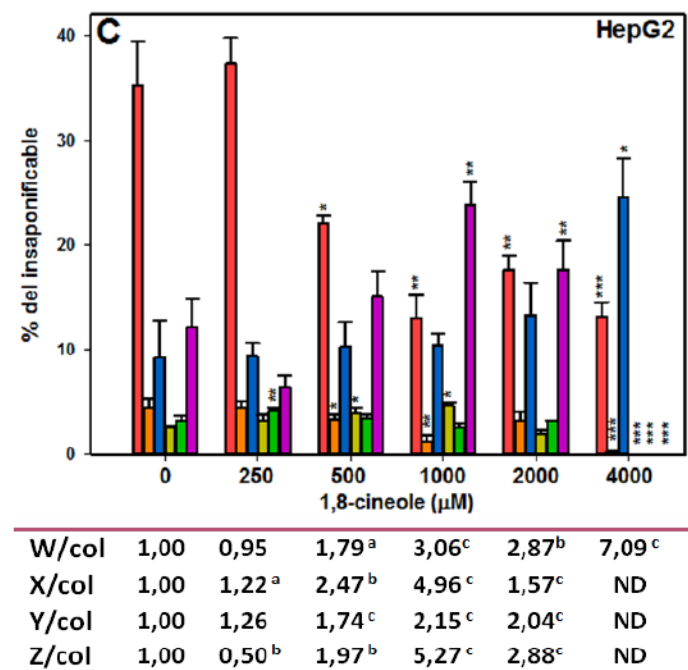
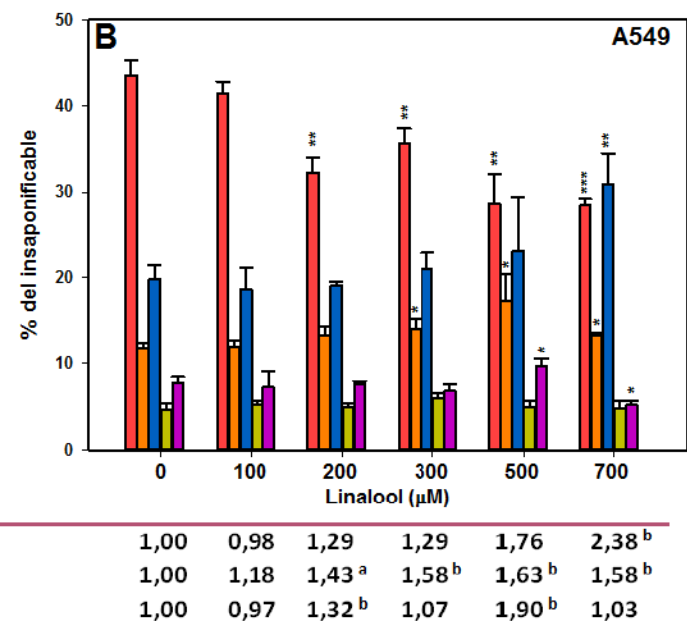
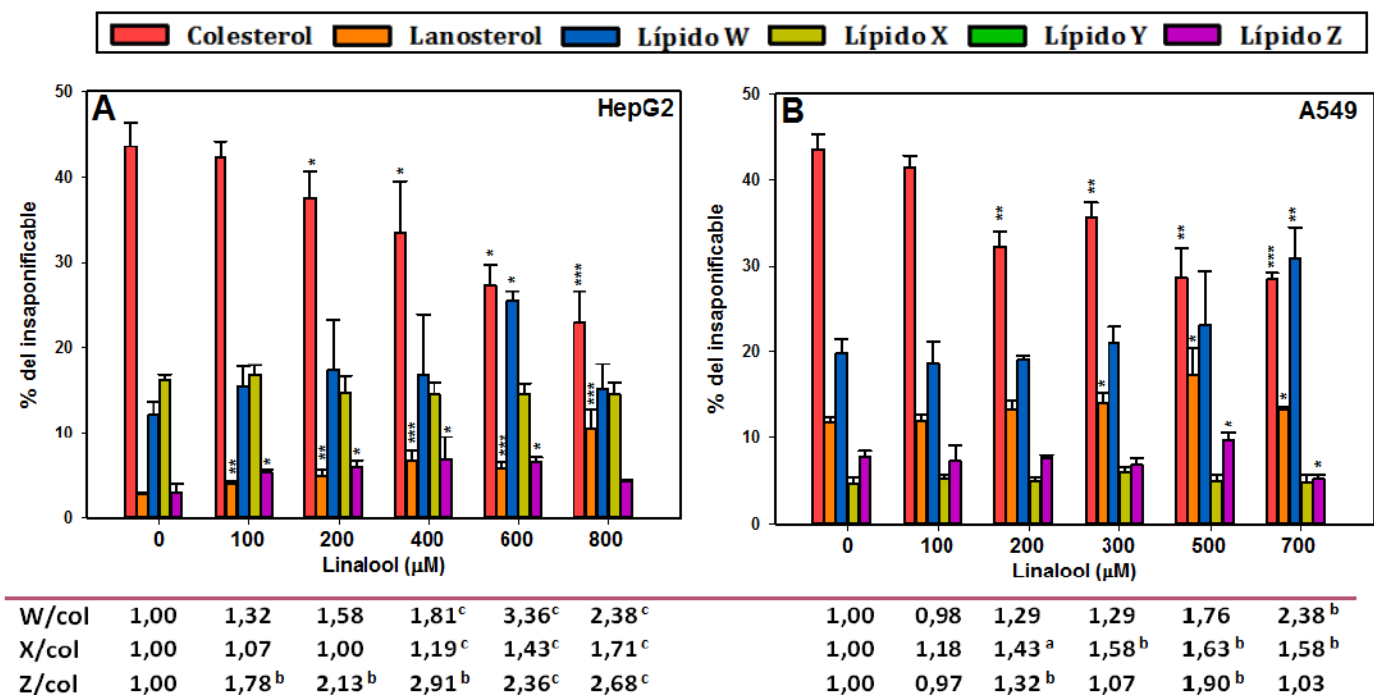


Figura 5.5. Incorporación de ¹⁴C-acetato en lípidos insaponificables de la vía del mevalonato no identificados. (A-D) Distribución porcentual de la marca radiactiva incorporada en cada especie lipídica respecto del total del insaponificable y la relación de dichas proporciones respecto al colesterol (W-X-Y-Z/col). Los resultados de para la distribución de la marca incorporada en cada especie respecto del total en lípidos insaponificables se expresan como el promedio ± DS. * p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001. La relación entre el porcentaje de marca incorporada en cada especie lipídica (W, X, Y y Z) respecto de la incorporada en colesterol se expresa en unidades arbitrarias asumiendo un valor de 1,0 para las células control. (a) p <0,05; (b) p <0,01; (c) p <0,001.

5.1.2. Niveles de HMGCR

Los resultados presentados en la sección 5.1.1 muestran que a bajas-moderadas concentraciones de LN y CN se produjo una inhibición de la colesterogénesis con variaciones importantes en alguno de los intermediarios y/u otros productos de la VM, sin cambios significativos en la incorporación de ^{14}C -acetato en LIT. En cambio, a concentraciones mayores la marca radiactiva asimilada en LIT disminuye abruptamente. A los efectos de dilucidar si la diferencia observada es producto de una acción inhibitoria de estos isoprenoides sobre la HMGCR. Se determinaron mediante Western blot los niveles de la enzima en las células HepG2 tratadas con concentraciones de linalool y 1,8-cineole que fueron denominadas bajas (que inhiben moderadamente la colesterogénesis pero no la incorporación de acetato en LIT), intermedias (que inhiben marcadamente la colesterogénesis sin afectar significativamente la incorporación de acetato en LIT) o elevadas (que inhiben profundamente tanto la síntesis de colesterol como la incorporación de acetato en LIT).

Los tratamientos con LN 200 μM o CN 750 μM (concentraciones bajas) no afectaron considerablemente los niveles de HMGCR, los cuales se mantuvieron comparables a los de las células control. A concentraciones intermedias (LN 400 o CN 1500 μM), se produjo una reducción significativa en los niveles de la enzima que resultó más pronunciada para el tratamiento con linalool. Cuando las células fueron incubadas con LN 800 μM o CN 3000 μM (concentraciones altas), se observó un descenso notable en la cantidad de la reductasa, siendo nuevamente linalool el monoterpeno más efectivo. Un tratamiento adicional de las células con SV 5 μM se utilizó como control positivo del aumento en los niveles de HMGCR (Figura 5.6).

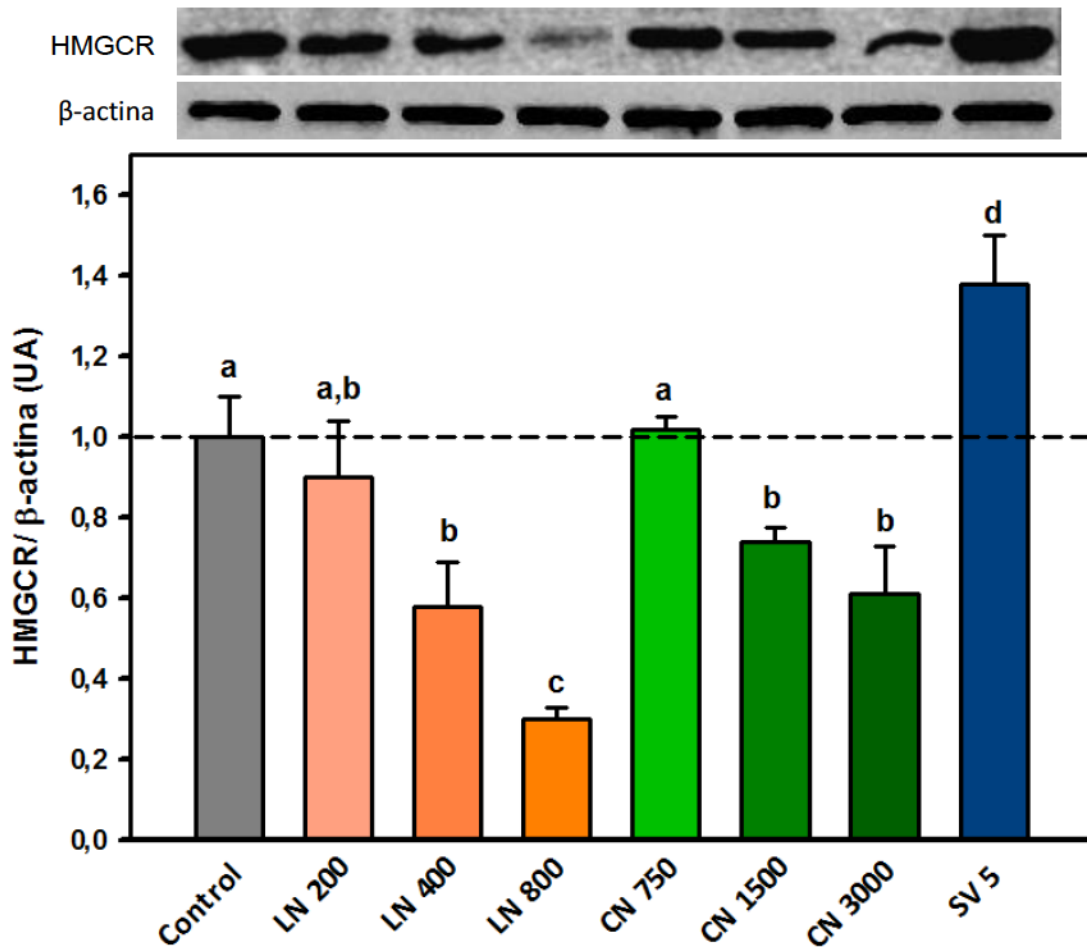


Figura 5.6. Efecto del linalool y 1,8-cineole sobre los niveles de HMGCR en células HepG2. Células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con los monoterpenos a concentraciones que inhiben solamente la colesterologénesis: linalool 200 μ M (LN 200) y 400 μ M (LN 400), y 1,8-cineole 750 μ M (CN 750) y 1500 μ M (CN 1500), o que inhiben tanto la colesterologénesis como la incorporación de acetato en LIT: linalool 800 μ M (LN 800) y 1,8-cineole 3000 μ M (CN 3000). Se utilizó simvastatina 5 μ M (SV 5) como control positivo del aumento en los niveles de HMGCR. Las bandas inmunoreactivas fueron cuantificadas por densitometría y normalizadas con β -actina. Los resultados se expresan relativos al control como el promedio \pm DS ($n=3$); Letras diferentes (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). UA= unidades arbitrarias.

5.2. ACCIÓN DEL LINALOOL Y 1,8-CINEOLE SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS NEUTROS, FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

Con la intención de ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción del linalool y 1,8-cineole sobre el metabolismo lipídico en general, se realizaron ensayos para determinar el efecto de los tratamientos sobre el contenido, incorporación y exportación de colesterol en ambas líneas celulares, así como también sobre la incorporación de ^{14}C -acetato y/o el contenido en otros lípidos neutros, fosfolípidos y ácidos grasos en células HepG2.

5.2.1. Contenido de colesterol

Células HepG2 y A549 se trataron con concentraciones de LN y CN que inhiben solamente la colesterogénesis (concentraciones bajas: LN 200 μM y CN 200 μM en ambas líneas celulares) o bien que afectan la síntesis de colesterol y de LIT (concentraciones altas: LN 750 μM y CN 3000 μM para HepG2; LN 550 μM y CN 2500 μM para A549). Se extrajeron los lípidos por el método de Folch y las especies lipídicas fueron separadas por TLC (Figura 5.7, panel A). Se determinó el contenido de CL y CE como se detalló en la sección 3.7.

En células HepG2 tratadas con concentraciones bajas de los monoterpenos se observó una tendencia a disminuir el contenido de CT a expensas de CL, sobre todo para el tratamiento con 1,8-cineole, sin embargo las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. A concentraciones altas, los niveles de colesterol fueron comparables al de las células control (Figura 5.7, panel B).

Sorpresivamente, en células A549 se produjo un aumento significativo del contenido de CL (y en consecuencia de CT) al tratarlas con LN 200 μM , sin apreciarse cambios en el resto de los tratamientos (Figura 5.7, panel C).

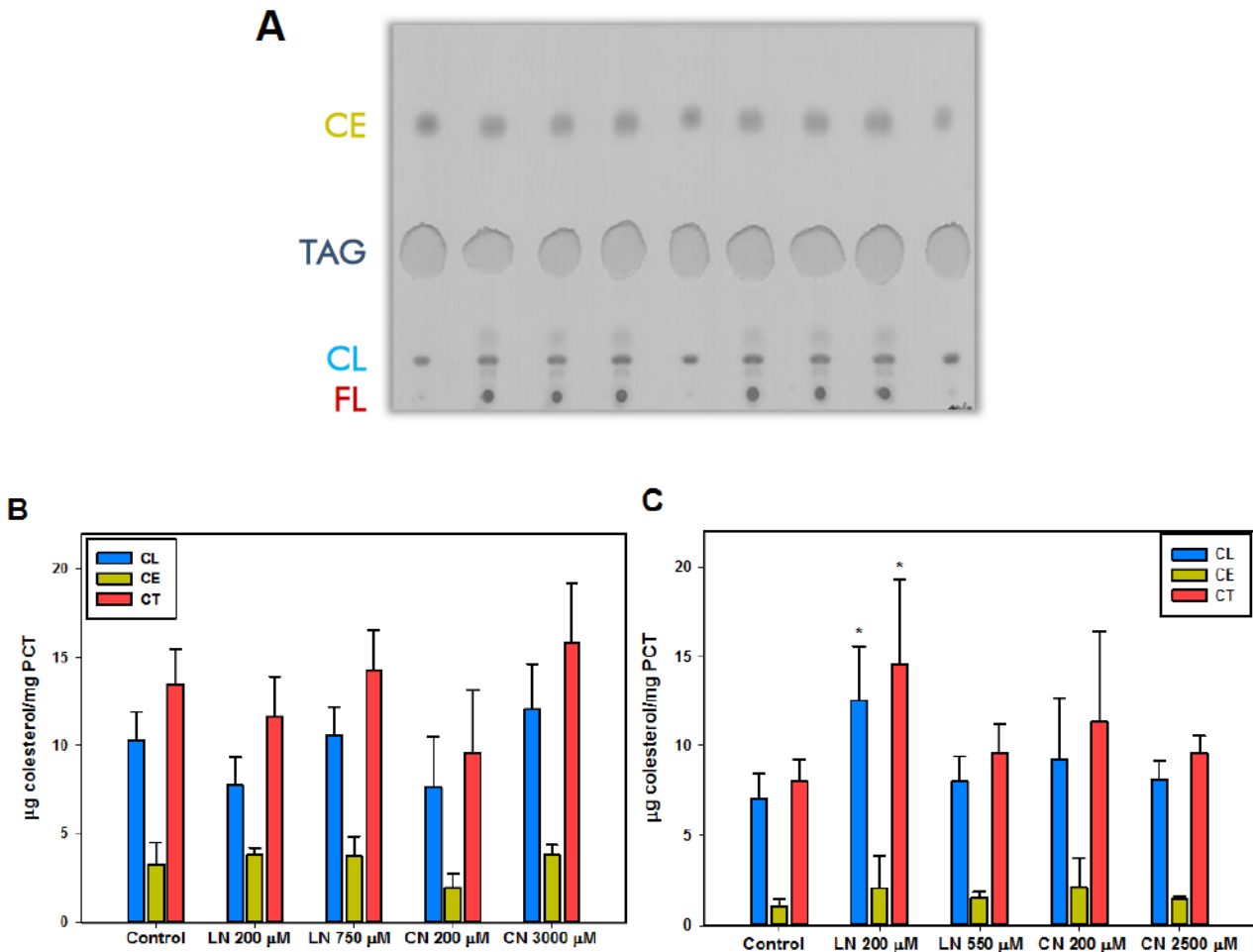


Figura 5.7. Determinación del contenido de colesterol en células HepG2 y A549 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células se trataron con LN 200 μM , LN 750 μM , CN 200 μM o CN 3000 μM (HepG2) o LN 200 μM , LN 550 μM , CN 200 μM o CN 2500 μM (A549) durante 48 horas. Se extrajeron LT que posteriormente fueron resueltos por TLC. El CL y CE presente en las placas se reveló aplicando una solución ácida de cloruro férrico en forma de spray sobre la placa con posterior carbonización a 180 $^{\circ}\text{C}$ (panel A) para luego cuantificarse por densitometría. Se muestran los resultados de la cuantificación de colesterol en células HepG2 (panel B) y A549 (panel C). Los datos se expresan como el promedio \pm DS ($n=3$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2.2. Incorporación y exportación de ^3H -colesterol

Hasta el momento resulta evidente que ambos monoterpenos fueron capaces de inhibir la biosíntesis de colesterol a partir de bajas concentraciones. Sin embargo, no se observó una disminución significativa en el contenido de colesterol. Más aún, en células A549 se produjo una acumulación considerable de colesterol al tratar las células con LN 200 μM , mientras que para

CN 200 μM la tendencia fue similar. Por ello se determinó el efecto de linalool y 1,8-cineole sobre la incorporación y exportación de ^3H -colesterol en ambas líneas celulares.

El tratamiento de células HepG2 con LN 200 μM provocó un incremento significativo de un 14% en la incorporación de colesterol exógeno. Llamativamente, el tratamiento con CN 200 μM resultó en una disminución del 15% en la captación de este lípido. Por otra parte, ninguno de los 2 isoprenoides produjo modificaciones sobre la exportación de colesterol en las condiciones estudiadas (Figura 5.8, panel A).

En células A549, únicamente el tratamiento con LN afectó los procesos estudiados, induciendo un aumento significativo de la incorporación de ^3H -colesterol cercano al 50% y provocando al mismo tiempo una caída del 10% en su exportación (Figura 5.8, panel B).

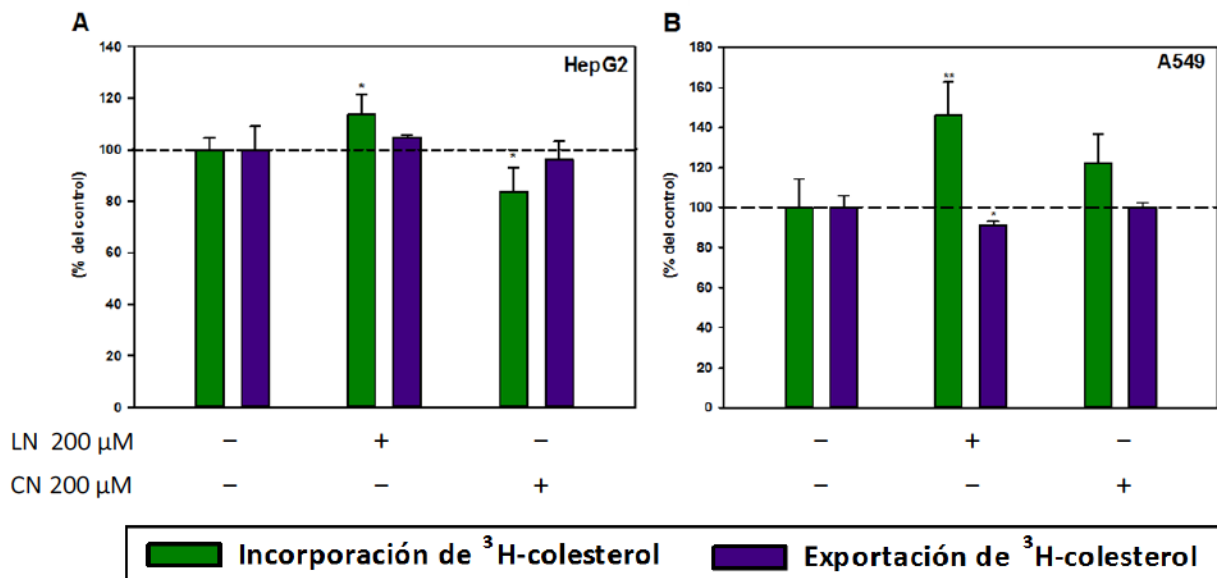


Figura 5.8. Incorporación y exportación de ^3H -colesterol en células incubadas con linalool y 1,8-cineole. Las células se trataron durante 48 horas con LN 200 μM o CN 200 μM . Los resultados se expresan como el promedio \pm DS (n=4); *p <0,05; **p <0,01.

5.2.3. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos neutros y polares

Para estudiar la incorporación de acetato en las diferentes especies fosfolipídicas así como también en lípidos neutros como TAG y CE entre otros, células HepG2 fueron incubadas durante 48 horas en presencia de concentraciones crecientes de LN (200, 400 y 750 μM) o CN

(200, 1000 o 3000 μM) adicionando ^{14}C -acetato al medio de cultivo durante las últimas 3 horas. Se extrajeron lípidos totales a partir de los cuales se analizó la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos totales (AGT) y LT según lo descrito en el ítem 3.8.1 y en lípidos neutros y polares separados, detectados y cuantificados según lo mencionado en la sección 3.8.2 (Figura 5.9).

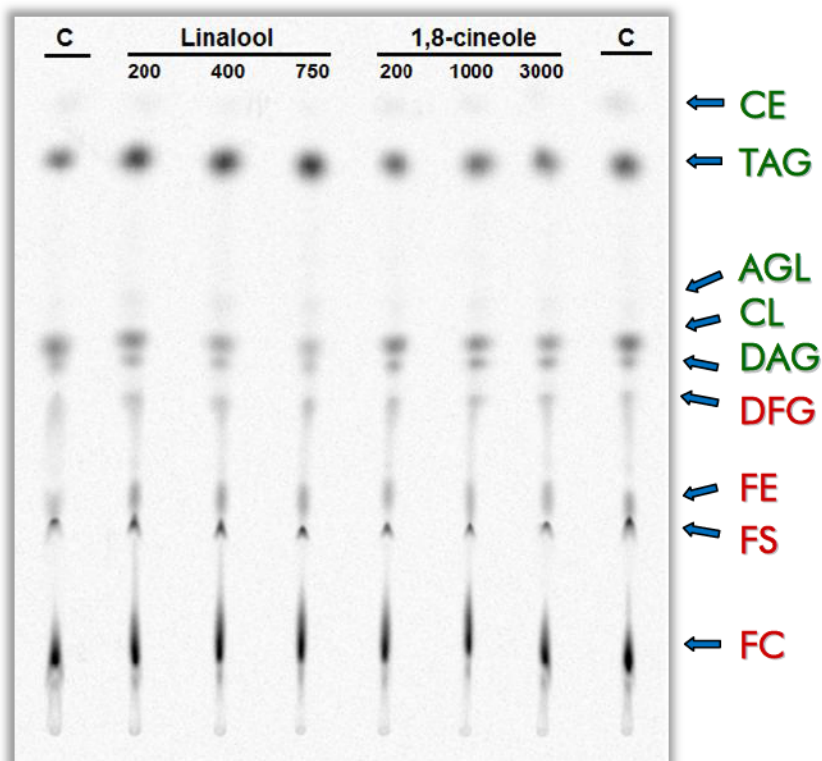


Figura 5.9. Separación e identificación de lípidos neutros y polares radiactivos. Luego de la separación de los fosfolípidos en una primera etapa (siglas en rojo) y posterior separación de los lípidos neutros en una segunda corrida (siglas en verde), las placas de TLC fueron expuestas a una pantalla Phosphor Screen (GE, Healthcare) y escaneadas en un equipo Storm 840. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el software Image J y las especies lipídicas fueron identificadas a partir de los estándares correspondientes. CE: colesterol esterificado, TAG: triacilglicéridos, AGL: ácidos grasos libres, CL: colesterol libre, DAG: diacilglicéridos, DFG: difosfatidilglicerol, FE: fosfatidiletanolamina, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina.

5.2.3.1. Ácidos grasos y lípidos totales

El análisis de los resultados de la cuantificación de incorporación de ^{14}C -acetato en LT y AGT reveló un comportamiento diferente para cada isoprenoide: linalool promueve la incorporación de acetato a partir de 200 μM en AGT y de 400 μM en LT mientras que 1,8-

cineole provoca el efecto contrario, inhibiendo significativamente la incorporación de marca radiactiva a partir de 1000 μM en AGT y de 4000 μM en LT (Figura 5.10).

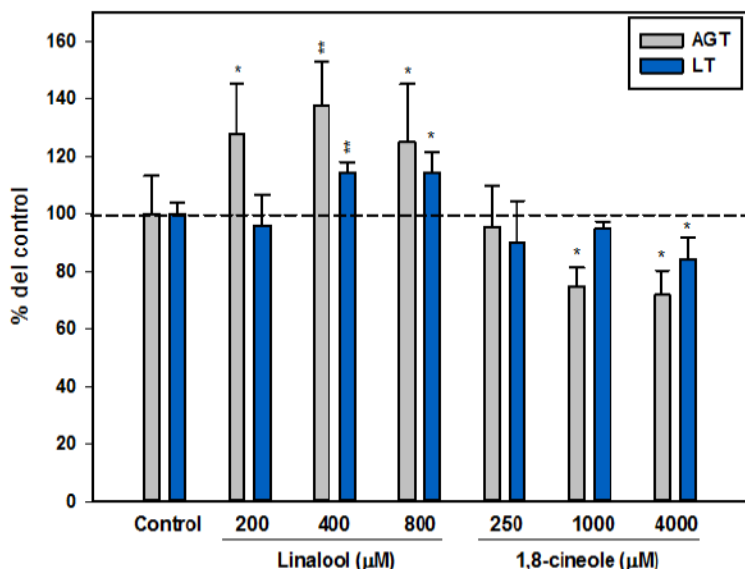


Figura 5.10. Incorporación de ^{14}C -acetato ácidos grasos y LIT en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de LN y CN que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -acetato las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en AGT y LT se determinó por centelleo líquido en un contador a Wallac 1214 Rack Beta. Los resultados muestran el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.3.2. Lípidos neutros

La incorporación de ^{14}C -acetato en CL disminuyó de manera dosis-dependiente tanto en los tratamientos con LN como con CN para las 3 concentraciones estudiadas, en concordancia con lo expuesto en la sección 5.1.1 para el análisis de lípidos insaponificables.

Linalool y 1,8-cineole provocaron además una caída de la incorporación de marca en CE que resultó significativa a partir de las concentraciones más bajas ensayadas para cada monoterpeno y que alcanzó hasta un 67 y un 55% para los tratamientos con LN 750 μM y CN 3000 μM respectivamente.

La diferencia más destacable se observó al analizar los TAG. Los tratamientos con linalool indujeron un aumento dosis-dependiente de la marca incorporada de hasta un 62% a 750 μM , mientras que para todas las concentraciones ensayadas de 1,8-cineole los niveles de acetato incorporado fueron semejantes al de las células control.

Contrario a lo expuesto anteriormente, la cuantificación de radiactividad en DAG evidenció un incremento sustancial de la marca para los tratamientos con CN de hasta un 50% por encima del control sin apreciarse variaciones significativas para las células expuestas a LN.

Al cuantificar las manchas correspondientes a los AGL resultó evidente un aumento sustancial de la incorporación de acetato del 55 al 70% para los tratamientos con LN. Ninguna de las tres concentraciones de CN evaluadas indujo cambios respecto al control (Figura 5.11).

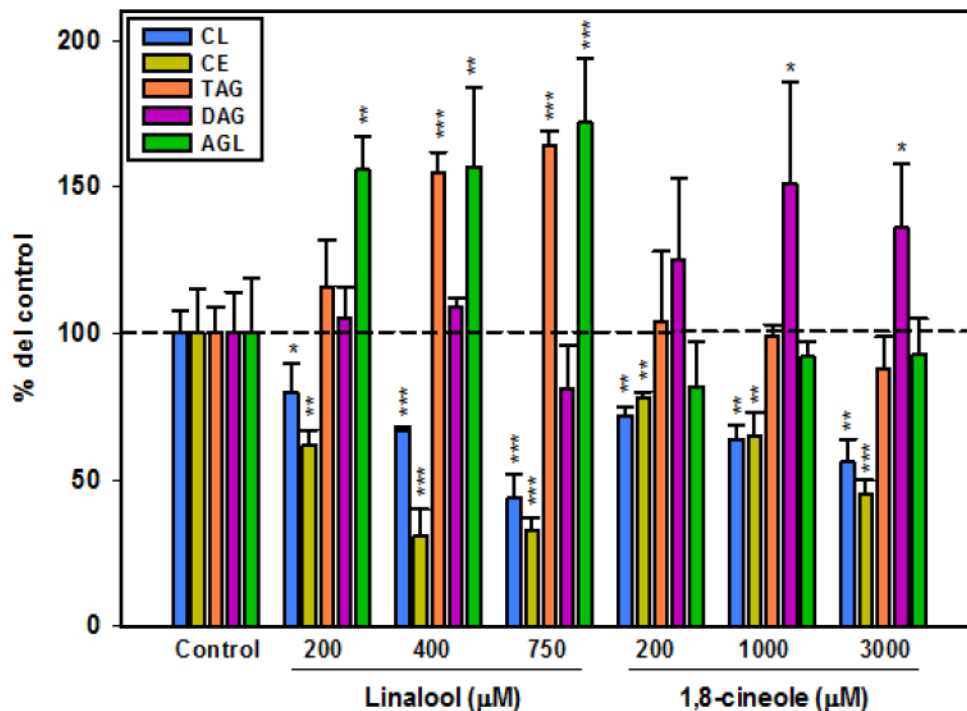


Figura 5.11. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos neutros en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de LN y CN que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando $2 \mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -acetato las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad lípidos neutros fue revelada por autorradiografía y cuantificada por densitometría. Los resultados muestran el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.3.3. Fosfolípidos

Entre los fosfolípidos que pudieron ser detectados, identificados y cuantificados en estos experimentos están FC, FS, FE y DFG.

Los tratamientos con linalool promovieron la incorporación de acetato en FL totales (FLT) a partir de la concentración intermedia ($400 \mu\text{M}$) el cual parece producirse particularmente a

expensas de un incremento en FC, el fosfolípido mayoritario, sin detectarse cambios en ninguna de las demás especies fosfolípídicas (Figura 5.12).

Por el contrario, 1,8-cineole inhibió la incorporación de radiactividad en FLT a la máxima concentración ensayada (3000 μM), concentración a la cual las especies FC y FS mostraron una disminución significativa de la marca incorporada. El efecto inhibitorio sobre FS resultó evidente a partir de 200 μM e independiente de las concentraciones empleadas (Figura 5.12).

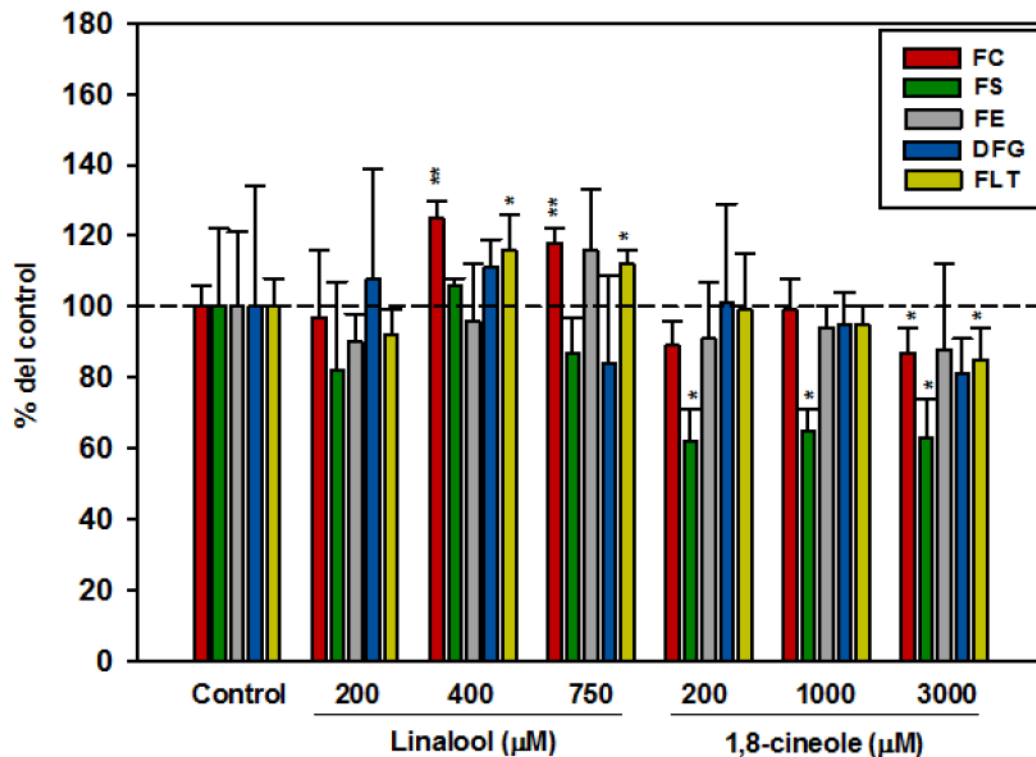


Figura 5.12. Incorporación de ^{14}C -acetato en fosfolípidos en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de LN y CN que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de ^{14}C -acetato las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad fosfolípidos fue revelada por autorradiografía y cuantificada por densitometría. Los resultados muestran el promedio \pm DS ($n=4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2.4. Contenido de triacilglicéridos y fosfolípidos

Células HepG2 se trataron con concentraciones de LN y CN que no afectan la proliferación celular pero que inhiben significativamente la colesterogénesis (LN 200 μM y CN 200 μM , concentraciones bajas), o bien que afectan la síntesis de colesterol, fosfolípidos, TAG y

LT (LN 750 μM y CN 3000 μM , concentraciones altas). Se extrajeron los lípidos, las especies lipídicas fueron separadas por TLC y se determinó el contenido de TAG y FLT como se detalló en la Sección 3.7.

El análisis del contenido de TAG no evidenció variaciones significativas para ninguno de los tratamientos con ambos monoterpenos (Figura 5.13, panel A). Tampoco se detectaron diferencias en el contenido de FLT, aunque para el tratamiento con LN 750 μM se observó una tendencia de los mismos a acumularse (Figura 5.13, panel B).

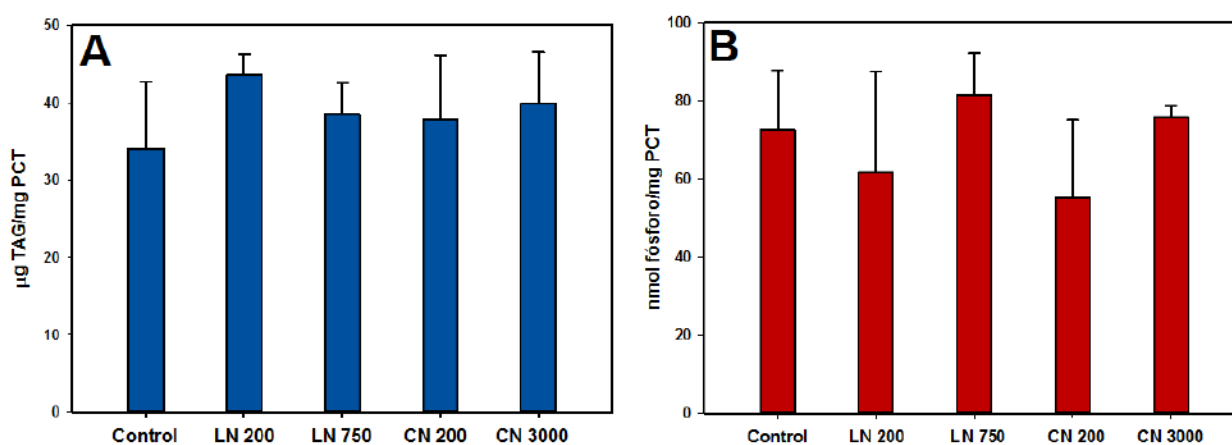


Figura 5.13. Determinación del contenido de triacilglicéridos y fosfolípidos en células HepG2 tratadas con linalool y 1,8-cineole. Células en fase exponencial de crecimiento se trataron con LN 200 μM (LN 200), LN 750 μM (LN 750), CN 200 μM (CN 200) o CN 3000 μM (CN 3000) durante 48 horas. Se extrajeron LT que posteriormente fueron resueltos por TLC. Las zonas correspondientes a TAG se rasparon de la sílica, los TAG se extrajeron con cloroformo y se cuantificaron colorimétricamente utilizando kit enzimático TG color (panel A). Las regiones correspondientes a FL se removieron de la placa, los FL se mineralizaron con ácido perclórico y se cuantificó el fósforo inorgánico (Pi) por el método de Chen (panel B). Los datos se expresan como el promedio \pm DS ($n=3$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3. EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE A PARES ENTRE LINALOOL, 1,8-CINEOLE Y SIMVASTATINA

5.3.1. Incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos de la vía del mevalonato

En la sección 5.1 se demostró que tanto linalool como 1,8-cineole a determinadas concentraciones son capaces de inhibir específicamente la colesterogénesis sin alterar los niveles de HMGCR, y que probablemente lo hagan afectando la VM a distintos niveles.

Por otra parte, sabiendo que la simvastatina es un inhibidor competitivo de la HMGCR y considerando las hipótesis propuestas para ambos monoterpenos, se plantea que los tratamientos combinados entre los isoprenoides y cada uno de ellos con la estatina podrían inhibir la colesterogénesis de manera sinérgica.

La importancia de investigar el efecto de estos tratamientos combinados sobre otros productos y/o intermediarios de la vía es relevante, ya que su deficiencia o acumulación por sobre ciertos límites podría tener implicancias determinantes sobre otros procesos celulares.

Previo a los ensayos de sinergismo resultó necesario evaluar el efecto de la simvastatina sobre la biosíntesis del colesterol en ambas líneas celulares. Para ello se realizaron tratamientos con concentraciones crecientes de simvastatina en el rango de 0,01 a 5 μM en presencia de ^{14}C -acetato y se determinaron los valores de $\text{IC}_{50\text{sc}}$. La simvastatina inhibió significativamente la incorporación de acetato en colesterol a partir de 0,1 μM y 1 μM en células HepG2 y A549 respectivamente, siendo los $\text{IC}_{50\text{sc}}$ calculados de 0,30 μM para HepG2 y 2,1 μM para A549 (Figura 5.14).

Además, en células HepG2 la simvastatina ocasionó una drástica reducción de la marca radiactiva incorporada en lanosterol y ubiquinona a partir de 0,01 μM y en escualeno y LIT a partir de 0,5 μM (Figura 5.14, panel A). En células A549, la incorporación de acetato en lanosterol disminuyó a partir de 0,1 μM , mientras que para LIT sólo a la máxima concentración de estatina ensayada se registró un descenso significativo de la misma (Figura 5.14, panel B).

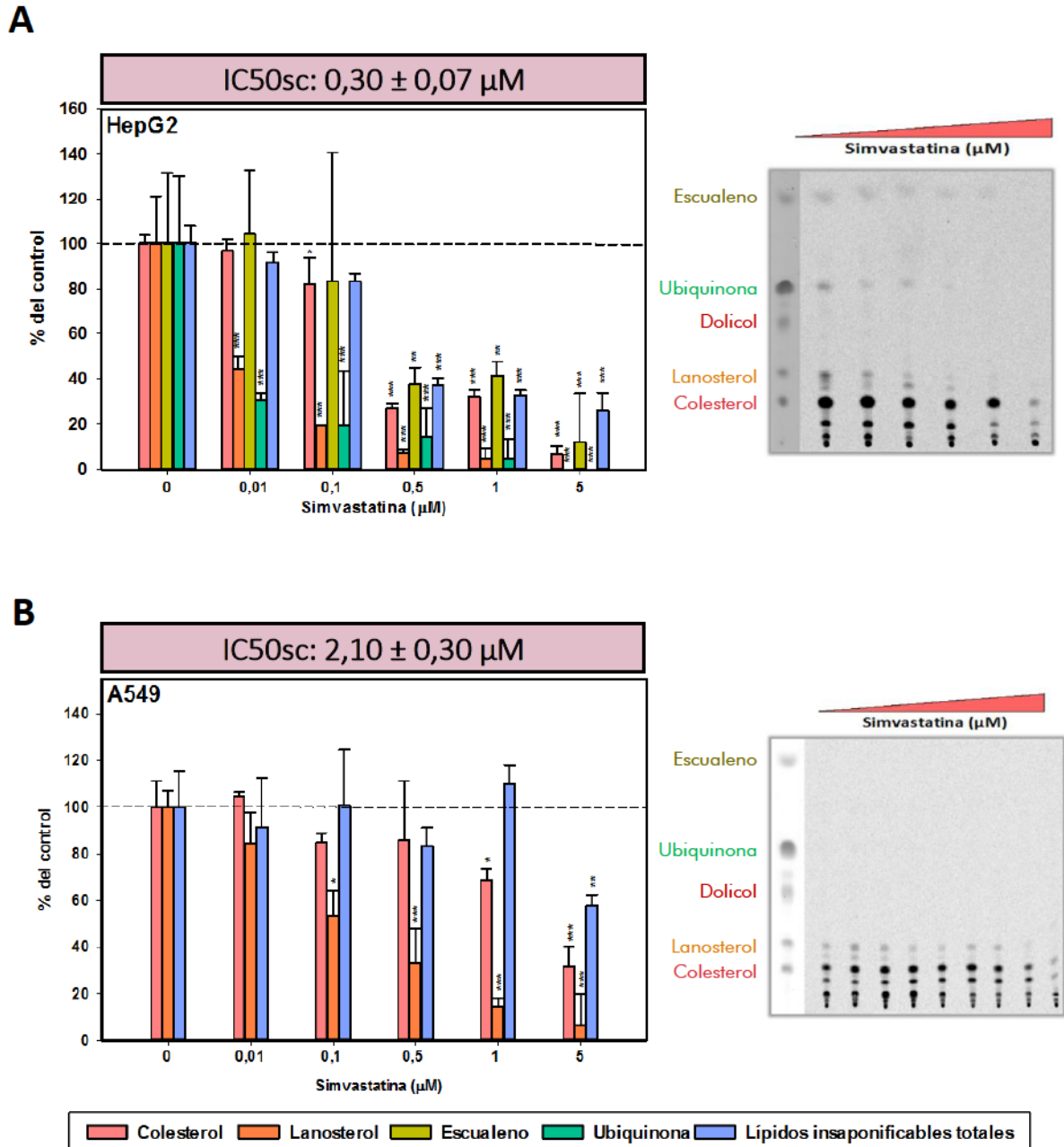
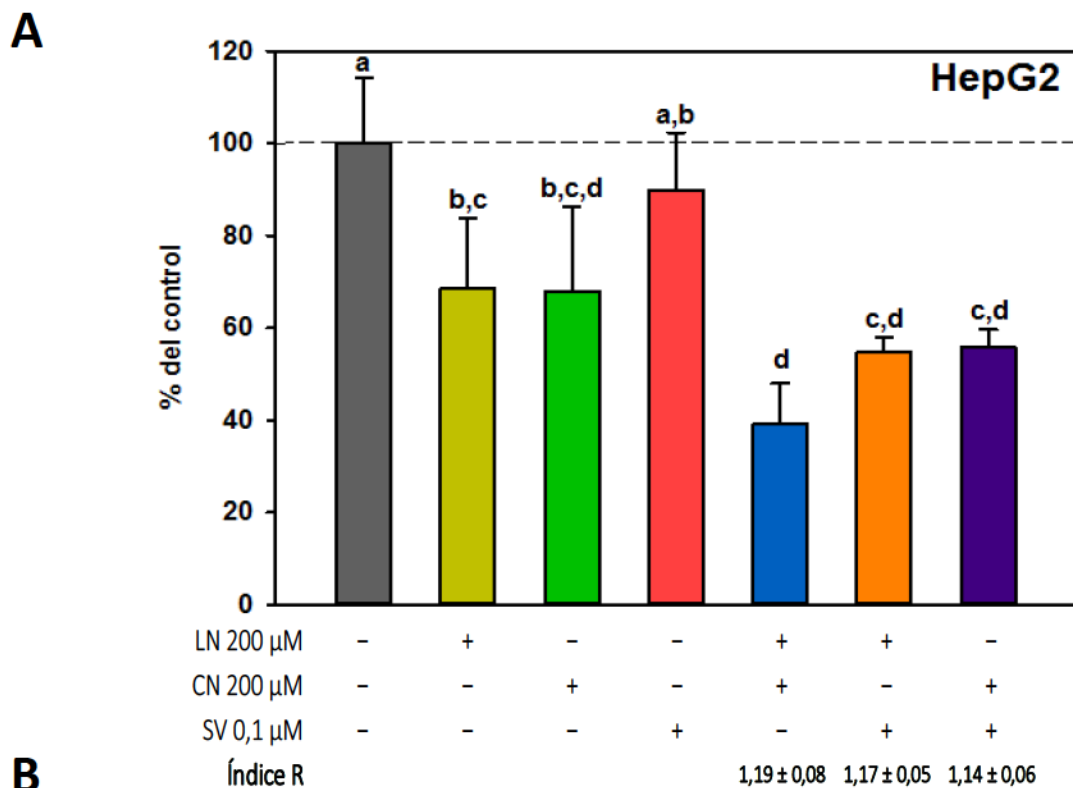


Figura 5.14. Incorporación de ^{14}C -acetato en colesterol y otros lípidos insaponificables de la vía del mevalonato en células tratadas con simvastatina. Las células se trataron con concentraciones crecientes de SV que no inhiben la viabilidad celular durante 48 horas, agregando $2\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -acetato durante las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en colesterol, lanosterol, escualeno, ubiquinona y LIT en HepG2 (A), y A549 (B) se reveló por autorradiografía y cuantificó por densitometría. Dolicol no fue detectado en ningún caso así como tampoco lo fue escualeno y ubiquinona en células A549. Las IC50sc se obtuvieron a partir de curvas de regresión no lineal. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las concentraciones adecuadas para evaluar el potencial efecto sinérgico anticolesterogénico de la combinación de los isoprenoides entre sí y de cada uno de ellos con la simvastatina. Las concentraciones elegidas fueron: LN y CN 200 μM para ambas líneas celulares (estos valores representan entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$ de sus $\text{IC}_{50\text{sc}}$), SV 0,1 μM para HepG2 y SV 1 μM para A549. Tanto las células hepáticas como las extra-hepáticas se trataron con los isoprenoides y la simvastatina (adicionados solos y combinados de a pares) analizando su efecto sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos de la VM por la incorporación de ^{14}C -acetato según se describe previamente. En células HepG2 se detectó y cuantificó la radiactividad incorporada en colesterol, lanosterol, ubiquinona, escualeno y LIT en todos los tratamientos mientras que en A549 solamente pudo cuantificarse en colesterol y LIT.

En células HepG2, el tratamiento combinado con ambos monoterpenos ocasionó un efecto sinérgico inhibitorio sobre la síntesis de colesterol (Figura 5.15, panel A). Además, se produjo un incremento de la marca radiactiva incorporada en ubiquinona, aunque sin diferencias respecto del efecto individual de cada isoprenoide. El aumento de ^{14}C -acetato incorporado en lanosterol por acción de LN se vio revertido al combinarse este monoterpeno con CN, mientras que la incorporación de acetato en escualeno tendió a disminuir (Figura 5.15, panel B).

Las combinaciones de cada monoterpeno con simvastatina también inhibieron sinérgicamente la biosíntesis de colesterol en las células hepáticas, de un 14 a un 17% por encima de lo esperado para una interacción aditiva (Figura 5.15, panel A). Respecto a otros lípidos de la VM, es importante destacar que los niveles disminuidos de ^{14}C -ubiquinona por acción de la simvastatina (aprox. 50%) fueron restablecidos a niveles de las células control al combinarse con cada isoprenoide. Estos resultados y los obtenidos para lanosterol, escualeno y LIT se presentan en el panel B de la figura 5.15.



	lanosterol	ubiquinona	escualeno	LIT
Control	100 \pm 7,5 ^a	100 \pm 29,6 ^a	100 \pm 24,2 ^a	100 \pm 15,8 ^a
LN 200 μ M	131,4 \pm 15,5 ^c	192,0 \pm 37,6 ^c	73,9 \pm 14,2 ^a	76,1 \pm 21,7 ^{a,b,c}
CN 200 μ M	70,4 \pm 18,8 ^{a,b}	194,9 \pm 58,0 ^{b,c}	82,8 \pm 9,3 ^a	79,6 \pm 17,5 ^{a,b,c}
SV 0,1 μ M	42,2 \pm 9,0 ^b	53,1 \pm 7,7 ^d	69,0 \pm 8,0 ^a	84,4 \pm 9,3 ^{a,b}
LN + CN	74,4 \pm 21,6 ^{a,b}	178,3 \pm 44,5 ^{b,c}	72,3 \pm 5,4 ^a	54,5 \pm 7,7 ^c
LN + SV	57,2 \pm 5,8 ^b	90,1 \pm 14,5 ^a	67,1 \pm 4,4 ^a	72,0 \pm 11,1 ^{b,c}
CN + SV	53,3 \pm 21,6 ^b	105,4 \pm 41,8 ^{a,b}	68,8 \pm 7,7 ^a	63,4 \pm 6,0 ^{b,c}

Figura 5.15. Efecto de la combinación entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos de la VM en células HepG2. Las células fueron tratadas con LN, CN o SV individualmente o combinadas de a pares durante 48 horas, agregando 2 μ Ci/ml de 14 C-acetato durante las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en colesterol (A) y otros lípidos de la VM (B) fue revelada por autorradiografía, cuantificada por densitometría, normalizada al contenido de PCT (DPM/mg PCT) y expresada como porcentaje del control. El efecto sinérgico sobre la inhibición de la síntesis de colesterol fue evaluado a partir del índice R según lo descrito en la sección 3.11. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado; letras distintas (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En células A549, el tratamiento combinado entre LN y CN provocó una inhibición sinérgica en la incorporación de 14 C-acetato en colesterol (Figura 5.16, panel A) en mayor proporción que para los LIT. Esto supone una acumulación de la marca radiactiva en otros

intermediarios y/o productos de la VM, de los cuales puede excluirse el ^{14}C -lanosterol, intermediario para el cual se detectó una fuerte tendencia a disminuir (Figura 5.16, panel B).

La combinación de LN y SV mostró un efecto sinérgico inhibitorio muy significativo sobre la síntesis de colesterol en células A549. Por otra parte, el tratamiento conjunto de CN y SV inhibió la colesterogénesis de manera aditiva pero no sinérgica (Figura 5.16, panel A).

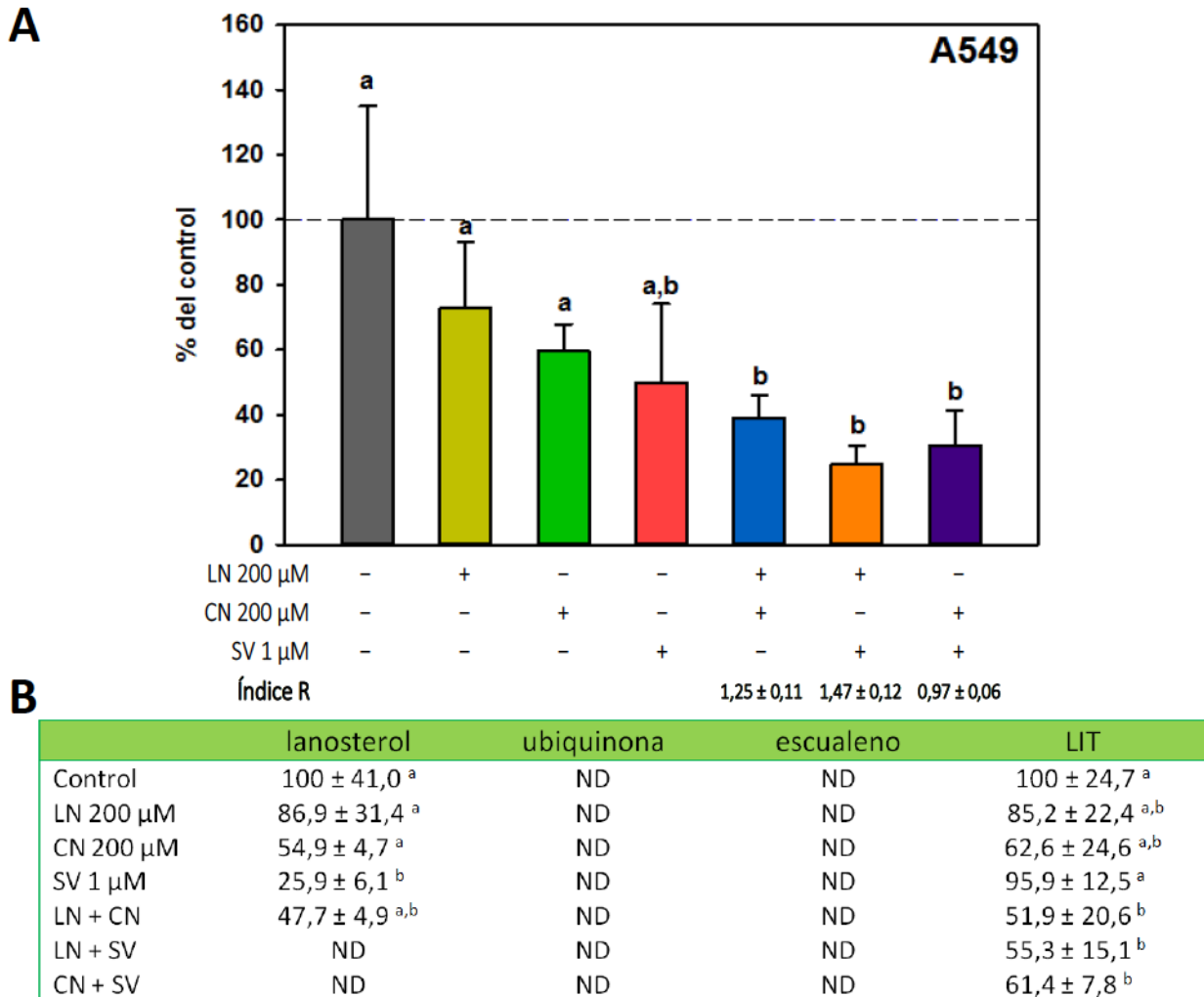


Figura 5.16. Efecto de la combinación entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre la síntesis de colesterol y otros lípidos de la VM en células A549. Las células fueron tratadas con LN, CN o SV individualmente o combinadas de a pares durante 48 horas, agregando 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de ^{14}C -acetato durante las últimas 3 horas. La incorporación de radiactividad en colesterol (A) y otros lípidos de la VM (B) fue revelada por autorradiografía, cuantificada por densitometría, normalizada al contenido de PCT (DPM/mg PCT) y expresada como porcentaje del control. El efecto sinérgico para la inhibición de la síntesis de colesterol fue evaluado a partir del índice R según lo descrito en la sección 3.11. Los resultados se expresan como el promedio \pm DS de dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado; letras distintas (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ND: no detectado.

5.3.2. Niveles de HMGCR

En esta sección se propuso analizar el efecto de la combinación de concentraciones bajas de cada monoterpeno sobre los niveles de HMGCR en células HepG2. Para ello, las células se trataron con LN 200 μM y CN 750 μM (concentraciones que individualmente no afectan los niveles de la enzima, sección 5.1.2), individualmente o combinados entre sí. Se determinaron los niveles de la enzima mediante Western blot.

Por otra parte, es sabido que uno de los efectos colaterales no deseados del empleo de estatinas en el tratamiento de la hipercolesterolemia es el aumento en los niveles de la HMGCR, como se evidenció en la sección 5.1.2 al tratar células HepG2 con simvastatina. En la misma sección, se demostró que concentraciones moderadas de ambos monoterpenos (LN 400 μM y CN 1500 μM) fueron capaces de disminuir significativamente los niveles de la reductasa. Por esta razón se planteó la hipótesis de que un tratamiento combinado de cada monoterpeno con la simvastatina podría contrarrestar el aumento de la HMGCR inducido por la misma. Células HepG2 fueron tratadas durante 48 horas con LN 400 μM , CN 1500 μM , SV 5 μM y las combinaciones de a pares entre cada monoterpeno y la estatina.

En el panel A de la figura 5.17 puede observarse que la combinación entre linalool y 1,8-cineole a bajas concentraciones causó una disminución del 20% en la cantidad de HMGCR ($p=0,051$).

Como era de suponerse, el tratamiento con SV 5 μM indujo la expresión de la reductasa provocando un aumento en sus niveles de aproximadamente un 32%. Al combinar la estatina con 1,8-cineole se apreció una muy leve tendencia de los niveles de HMGCR a disminuir. El tratamiento conjunto de linalool y simvastatina provocó un efecto más profundo aunque no estadísticamente significativo ($p=0.11$), promoviendo una caída de un 25% en la cantidad de la enzima respecto del tratamiento individual con la estatina y por lo tanto, restableciendo la cantidad de reductasa a los niveles encontrados en las células control (Figura 5.17, panel B).

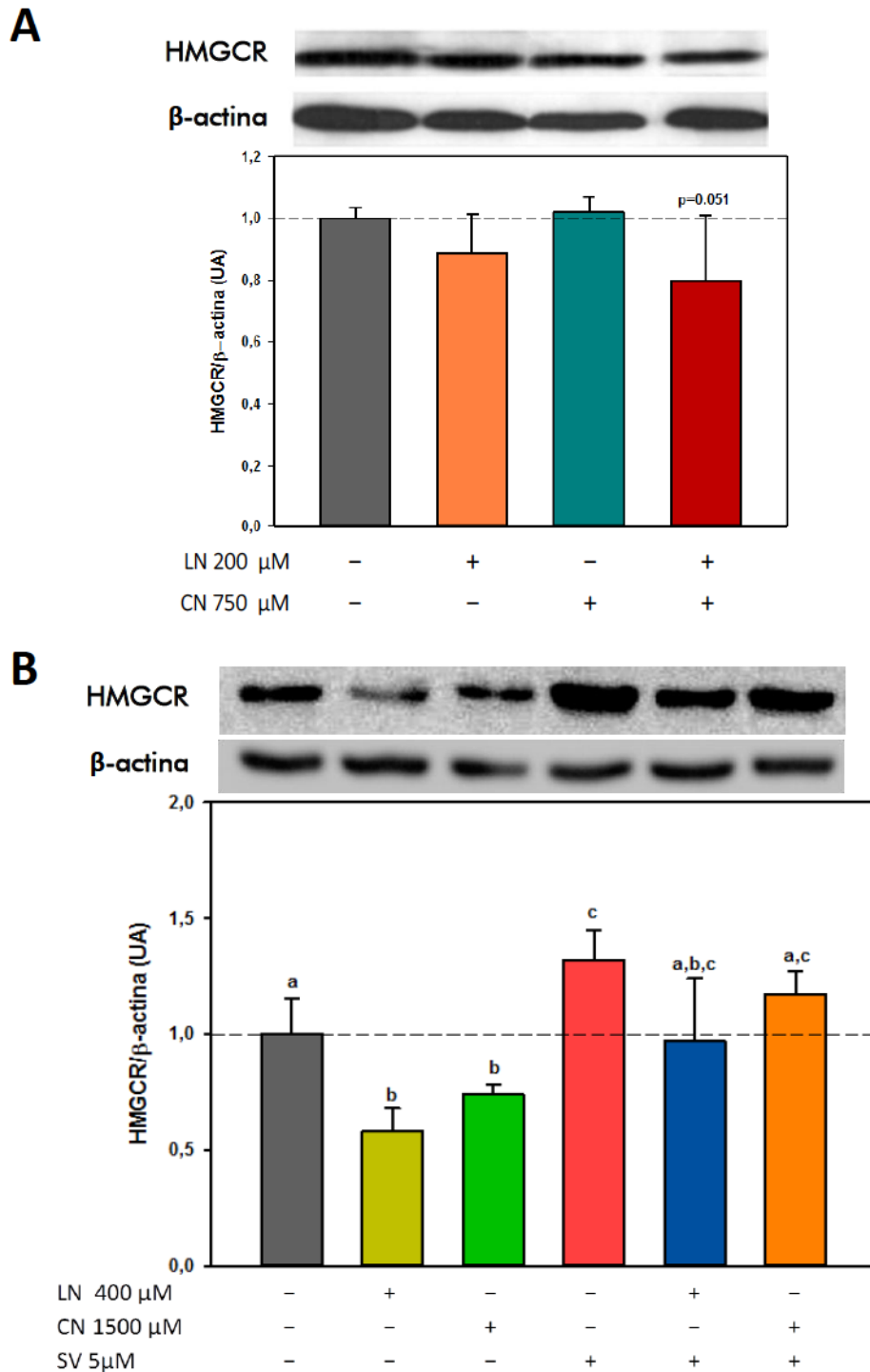


Figura 5.17. Efecto de la combinación de a pares entre linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre los niveles de HMGR en células HepG2. (A) Efecto de la combinación entre LN y CN a bajas concentraciones. (B) Combinación entre cada uno de los monoterpenos (a concentraciones intermedias) con simvastatina 5 μM . Las bandas inmunodetectadas fueron cuantificadas por densitometría y normalizadas con β -actina. Los resultados se expresan relativos al control como el promedio \pm DS (n=3); UA= unidades arbitrarias. Las distintas letras (a-c) indican diferencias significativas (p<0,05).

5.3.3. Efecto sobre el contenido de lípidos neutros y polares

5.3.3.1. Colesterol libre y esterificado

Con la intención de evidenciar si la inhibición sinérgica de la colesterogénesis se traduce en una disminución de los niveles de colesterol, células HepG2 y A549 en fase de crecimiento exponencial recibieron los tratamientos combinados de igual manera que para el ítem 5.3.1 y se determinó el contenido de CL y CE según lo descrito en la sección 3.7.2.

La combinación de los isoprenoides no modificó sustancialmente los niveles de CL y CE respecto de los tratamientos individuales ni de las células control en células HepG2 (Figura 5.18, panel A) mientras que en A549 el efecto conjunto de los monoterpenos revirtió el aumento producido en CL por la acción individual de linalool 200 μM (Figura 5.18, panel B).

Simvastatina no modificó en absoluto el contenido de colesterol de las células a la concentraciones ensayadas (0,1 y 1 μM en HepG2 y A549 respectivamente). En células A549 la combinación de la estatina con cada monoterpeno no alteró los niveles de colesterol (Figura 5.18, panel A). En las células hepáticas, al combinarse simvastatina con 1,8-cineole los niveles de colesterol decayeron en un 40-45% respecto del control y del tratamiento con simvastatina. La acción conjunta de la estatina con linalool también provocó efectos significativos sobre el contenido de colesterol que resultaron en una disminución profunda de un 50% respecto tanto de las células control como de las tratadas con simvastatina (Figura 5.18, panel B).

5.3.3.2. Triacilglicéridos y fosfolípidos

Así como se estudió el efecto individual de cada isoprenoide sobre el contenido de TAG y FLT también se evaluó para las combinaciones de a pares entre si y de cada uno con simvastatina. Si bien la combinación entre los monoterpenos provocó una tendencia a disminuir los niveles de FLT, las variaciones no resultaron significativas. Del mismo modo, tampoco se evidenciaron cambios en los niveles de TAG (Tabla 5.1).

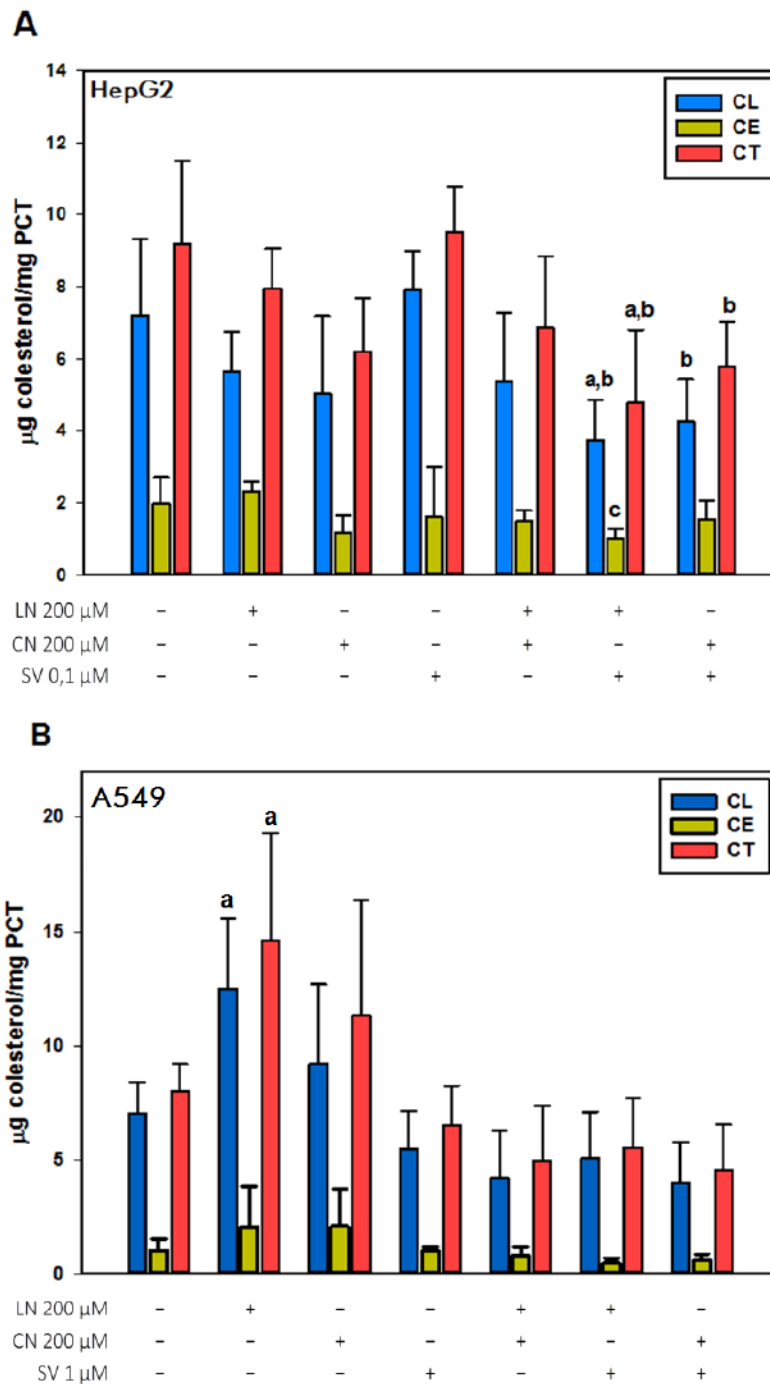


Figura 5.18. Efecto combinado del linalool, 1,8-cineole y simvastatina sobre el contenido de colesterol en células HepG2 (A) y A549 (B). Las células fueron tratadas con LN 200 µM, CN 200 µM, SV 0,1 µM (HepG2) o 1 µM (A549) y sus combinaciones de a pares durante 48 horas. Los LT fueron separados por TLC. El CL y CE se revelaron aplicando una solución ácida de cloruro férrico en forma de spray sobre la placa y posterior carbonización a 180°C, y se cuantificaron por densitometría. Los datos muestran el promedio ± DS (n=3); (a) $p < 0,05$ vs. Control; (b) $p < 0,05$ vs. SV 0,1 µM; (c) $p < 0,05$ vs. LN 200 µM.

Tabla 5.1. Contenido de TAG y FLT en células HepG2 tratadas con las combinaciones de a pares de linalool, 1,8-cineole y simvastatina

	TAG ($\mu\text{g TAG/mg PCT}$)	FLT (nmol Pi/mg PCT)
Control	$34,0 \pm 8,6$	$66,4 \pm 20,3$
LN 200 μM	$43,5 \pm 2,7$	$61,6 \pm 25,9$
CN 200 μM	$41,3 \pm 7,0$	$50,3 \pm 24,5$
SV 0,1 μM	$36,7 \pm 12,4$	$63,6 \pm 6,5$
LN + CN	$36,3 \pm 5,2$	$41,7 \pm 24,9$
LN + SV	$35,0 \pm 1,8$	$61,8 \pm 14,0$
CN + SV	$33,0 \pm 13,1$	$64,5 \pm 14,3$

Las células fueron tratadas con LN 200 μM , CN 200 μM , SV 0,1 μM y las respectivas combinaciones de a pares (LN+CN, LN+SV y CN+SV) durante 48 horas. Se detallan los resultados de la cuantificación de TAG y FLT. Los datos se expresan como el promedio \pm DS (n=3).

5.4. DISCUSIÓN

Los ensayos de incorporación de ^{14}C -acetato en lípidos insaponificables revelaron que tanto linalool como 1,8-cineole ejercen un efecto antioleogénico no hepatoselectivo, dado que los IC_{50}s calculados para cada isoprenoide son del mismo orden de magnitud en ambas líneas celulares.

La inhibición de la colesterogénesis inducida por estos monoterpenos puede atribuirse a múltiples efectos sobre la VM.

En células HepG2, concentraciones de los isoprenoides que inhibieron un 30 y un 70% la síntesis de colesterol (linalool 200 μM y 1,8-cineole 750 μM) afectaron etapas de la VM específicas de la colesterogénesis sin alterar los niveles de HMGCR. Si bien se requiere información adicional para dilucidar exactamente cual/es de las enzimas de la VM son inhibidas por estas concentraciones de los monoterpenos, linalool ejercería su acción inhibiendo enzima/s involucrada/s en la conversión de lanosterol a colesterol, dado que la incorporación de acetato en este intermediario aumentó significativamente a pesar de la inhibición profunda de la síntesis de colesterol. Por otra parte, 1,8-cineole parecería inhibir la conversión de escualeno en lanosterol, afectando alguna de las enzimas involucradas como lo son la escualeno monooxigenasa y/o la OSC. En ambos casos se produjo un redireccionamiento del destino del precursor FPP, el punto de ramificación más importante de la vía, hacia la síntesis de ubiquinona. Previamente fueron reportados resultados similares para los monoterpenos geraniol en células HepG2 (Polo et al. 2006) y perilyl alcohol en células NIH 373 (Ren et al. 1994).

Cuando las células HepG2 fueron tratadas a concentraciones mayores de los monoterpenos (linalool 800 μM y 1,8-cineole 4000 μM) se produjo una disminución significativa de aproximadamente un 70 y 40% en los niveles de HMGCR, causando una inhibición aún más profunda de la colesterogénesis sin inhibir la proliferación celular. A pesar de la fuerte disminución en la cantidad de HMGCR, la inhibición de la conversión de lanosterol en colesterol mediada por linalool fue suficiente como para ocasionar una acumulación de este intermediario y un aumento de la síntesis de ubiquinona. Por el contrario, la inhibición de la formación de lanosterol a partir de escualeno mediada por 1,8-cineole fue, en principio, insuficiente como

para producir un incremento de la incorporación de acetato en intermediarios de la VM ubicados corriente arriba y/o en ubiquinona.

Los resultados obtenidos para A549, donde solamente pudo ser detectada y cuantificada la incorporación de acetato en colesterol, lanosterol y LIT, coinciden parcialmente con los obtenidos en células HepG2. Cabe destacar que en esta línea celular, a diferencia de lo ocurrido en las células hepáticas, se produjo un aumento relativo de la relación lanosterol/colesterol para los tratamientos con 1,8-cineole. Esto supone un efecto inhibitorio mediado por este monoterpeno también en alguna/s etapa/s de la conversión de lanosterol a colesterol.

Asumiendo las identidades propuestas para los lípidos insaponificables no identificados "W, X, Y y Z" en base a las referencias bibliográficas mencionadas en la sección 5.1.1, linalool promueve la acumulación de 7-DHC y lathosterol en ambas líneas celulares, lo que indicaría una inhibición en la conversión de 7-DHC a colesterol a nivel de la DHCR7. En células HepG2, el hecho de que la incorporación de acetato en lanosterol aumentó de manera dosis dependiente y que la relación lanosterol/colesterol en general fue siempre mayor a la de 7-DHC/colesterol y lathosterol/colesterol, sugiere que linalool estaría inhibiendo alguna otra etapa en la conversión de lanosterol a colesterol. Por otra parte, 1,8-cineole produjo una acumulación de 7-DCH en ambas líneas celulares, lo que refuerza la hipótesis de que dicho isoprenoide estaría inhibiendo la conversión de lanosterol en colesterol en algún punto. Asimismo, este monoterpeno cíclico ocasionó un incremento notorio de 24,25-EC y/o desmosterol, tanto en células HepG2 como en A549. Es sabido que en condiciones donde existe una inhibición parcial de la actividad de la OSC, se ve favorecida la síntesis de 24,25-EC por sobre la de lanosterol, ya que la OSC presenta mayor afinidad por DOS que por MOS (Rowe et al. 2003). De modo que la acumulación de este oxisterol podría ser la consecuencia de la inhibición de la OSC mediada por 1,8-cineole. Dicha inhibición sería responsable además de la acumulación relativa de escualeno observada en células HepG2. Asimismo, se ha visto que 24,25-EC es capaz de inhibir la enzima DHCR24, que cataliza la conversión de desmosterol en colesterol, y por tanto un aumento de 24,25-EC podría generar también la acumulación de este intermediario (Zerenturk et al. 2012), favoreciendo la detección de marca radiactiva (proveniente de la incorporación de ^{14}C -acetato) en el lípido "Y".

La efectividad en la inhibición de la colesterogénesis fue comparable tanto entre monoterpenos como entre las líneas celulares. Aun así, en células HepG2 tratadas con concentraciones cercanas a la IC₅₀sc, linalool (400 μ M) provocó una disminución significativa en la cantidad de HMGCR mientras que 1,8-cineole (750 μ M) no alteró los niveles de la enzima. A las máximas concentraciones ensayadas ambos isoprenoides inhibieron la HMGCR, manteniéndose linalool como el monoterpeno más efectivo. Es factible que la notoria acumulación de lanosterol provocada por los tratamientos con linalool (significativa a partir de 200 μ M) esté asociada a la disminución de los niveles de la reductasa, habiéndose demostrado que dicho intermediario es un potente inductor de la degradación de HMGCR mediada por ubiquitinización (Goldstein et al. 2006). Por otra parte, la disminución del contenido reductasa causada por 1,8-cineole a partir de 1500 μ M podría ser consecuencia, entre otros factores, de la acumulación de 24,25-EC y/o desmosterol. Ambos compuestos han demostrado ser efectivos supresores de la activación de SREBP-2, mientras que 24,25-EC además promueve directamente la degradación de HMGCR en el proteosoma (Yang et al. 2006; Wong et al. 2007; Brown 2009). En la figura 5.19 se resumen los mecanismos propuestos recientemente mencionados para cada isoprenoide. Además del efecto promovido por la acumulación de distintos intermediarios y/o productos alternativos de la VM, otros mecanismos podrían estar afectando la expresión de la HMGCR. Por ejemplo, estos dos isoprenoides podrían inhibir la síntesis de esta enzima a nivel traduccional, como se ha postulado para isoprenoides no esteroideos de la VM no identificados (Goldstein et al. 2006; Burg et al. 2011) y para otros isoprenoides vegetales como limoneno y perilyl alcohol (Peffley et al. 2003). No obstante se necesita información suplementaria, como ensayos de expresión del ARNm y de actividad de la enzima, para profundizar el entendimiento de los mecanismos por los cuales estos dos isoprenoides modulan la expresión de HMGCR.

En las condiciones experimentales de este trabajo, la inhibición de la colesterogénesis no produjo una disminución significativa en los niveles de colesterol celular, probablemente debido a que las células fueron capaces de suplir sus requerimientos mediante un aumento de su incorporación y/o mediante la inhibición de su exportación. El colesterol puede ingresar a la célula de dos maneras: como colesterol libre a través del transportador NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1), o como LDL-C a través del LDLR. Al igual que para LDLR, la expresión de NPC1L1 es

regulada positivamente por SREBP-2 (Yu et al. 2006; Pramfalk et al. 2010). A concentraciones bajas de ambos monoterpenos (200 μM), el aumento en la incorporación de colesterol exógeno impulsado por linalool en ambas líneas celulares y la disminución de la exportación promovida por 1,8-cineole en las células pulmonares sugiere la puesta en marcha de ciertos mecanismos compensatorios. Además, la notable incorporación de ^3H -colesterol en células A549 tratadas con linalool 200 μM coincide con la acumulación del contenido de colesterol producido en iguales circunstancias.

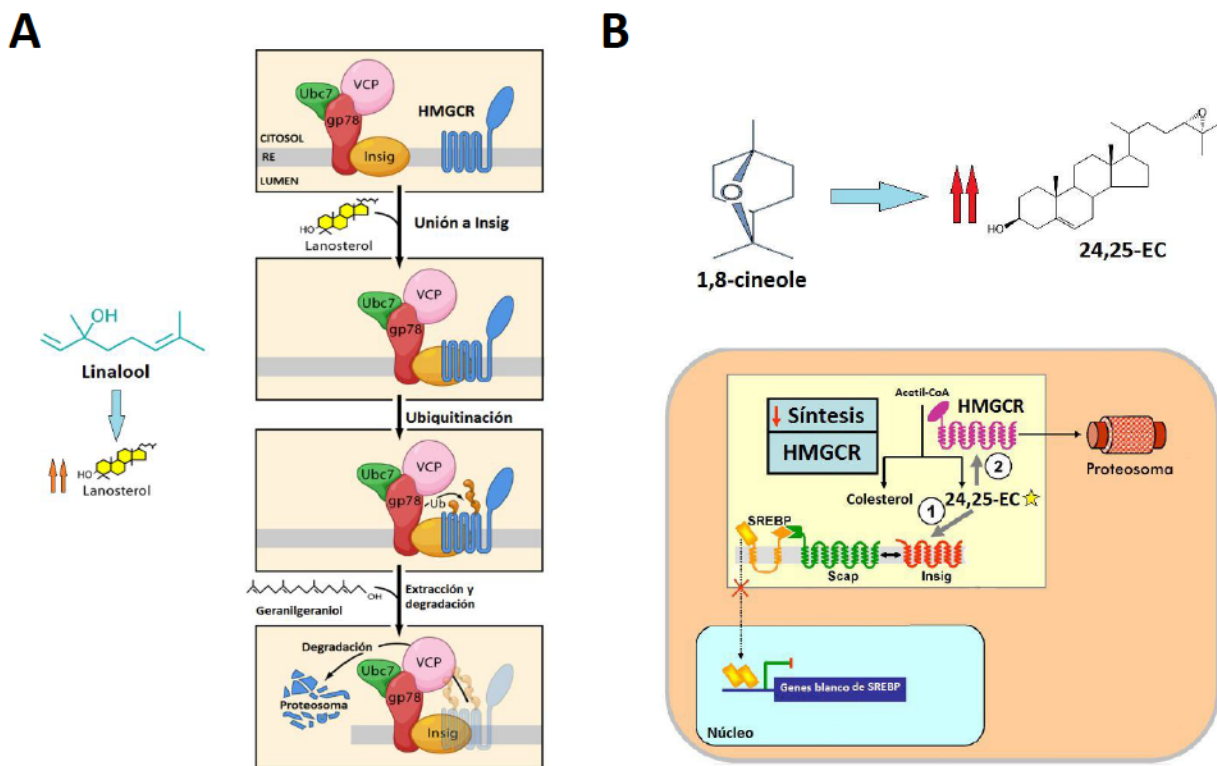


Figura 5.19. Degradación de HMGCR mediada por lanosterol y 24,25-EC. (A) Lanosterol promueve la unión de HMGCR a Insig, el cual se encuentra unido a un complejo ubiquitin ligasa (gp78-Ubc7- VCP) que conjuga la ubiquitina a la reductasa, la extrae de la membrana y la dirige al proteosoma para su degradación en un proceso estimulado por geranylgeraniol por un mecanismo no dilucidado (Adaptado de Goldstein 2006). (B) 24,25-EC se une a Insig y provoca la supresión de la actividad de SREBP (1) así como también regula la actividad de HMGCR a nivel postraduccional estimulando su degradación proteosómica (2) (Adaptado de Brown 2009).

El estudio de la incorporación de ^{14}C -acetato en ácidos grasos, lípidos polares y lípidos neutros en células HepG2 muestra que 1,8-cineole inhibió la incorporación de acetato en AGT, FL y LT mientras que linalool, contrariamente a lo esperado, la estimuló.

El 1,8-cineole inhibió la síntesis de ácidos grasos totales y esta sería la causa de la disminución significativa de la incorporación de acetato en FS y FC, y por ende en FLT (como se observó a 3000 μM). Estos resultados son coincidentes con los publicados por Jun y colaboradores, en donde 1,8-cineole reduce la expresión de SREBP-1c (y por ende de FAS) en células hepáticas, desconociéndose el mecanismo por el cual el monoterpeno afecta la expresión de este factor de transcripción (Jun et al. 2013). Como se puede observar en la figura 5.19, el 24,25-EC es capaz de interactuar con Insig y suprimir la actividad SREBP y por ende la síntesis lipídica, lo que refuerza la hipótesis de la acumulación del epoxicolesterol por inhibición parcial de la OSC mediada por 1,8-cineole.

En las condiciones aquí experimentadas, linalool promovió un importante aumento de la incorporación de acetato en AGL, TAG, FC y LT. Como es sabido, en respuesta a una disminución en los niveles de colesterol se produce el clivaje del precursor de SREBP-2. En su forma activa, el factor de transcripción induce la expresión de los genes de HMGCR y LDLR entre otros, con el fin de compensar la depleción de este lípido esteroideo. Recientemente se han identificado nuevas regiones genómicas bajo la regulación de SREBP-2, entre las que se encuentra una que codifica para un microARN altamente conservado. Este microARN se denomina miR-33 y una de sus funciones es inhibir la β -oxidación de AGL a través de la supresión de varias enzimas (Van Rooyen et al. 2011). Cuando los niveles de colesterol son bajos y se produce la activación de SREBP-2, estos mecanismos permiten retener el colesterol intracelular e incrementar la disponibilidad de AGL de cadena larga necesarios para formar ésteres de colesterol, que son la forma predilecta y más “segura” de almacenarlo (Figura 5.20) (Gerin et al. 2010; Van Rooyen et al. 2011). Asimismo, aunque existe cierta preferencia de SREBP-2 por activar genes involucrados en la síntesis de colesterol, se ha sugerido que también es capaz de activar la mayoría de aquellos relacionados con la síntesis de ácidos grasos, sobre todo cuando se expresa por encima de los niveles fisiológicos (Horton et al. 2002). La elevada síntesis de TAG podría ser simplemente consecuencia de la inducción de los genes lipogénicos en general, aunque también

podría tratarse de un mecanismo protector para secuestrar el exceso de AGL de manera no tóxica. Esto se debe a que los AGL, junto con otras especies como acil-CoA, DAG y ceramidas, promueven la disfunción y muerte celular en un proceso denominado “lipotoxicidad” (Listenberger et al. 2003; Schaffer 2003; Karagianni et al. 2015).

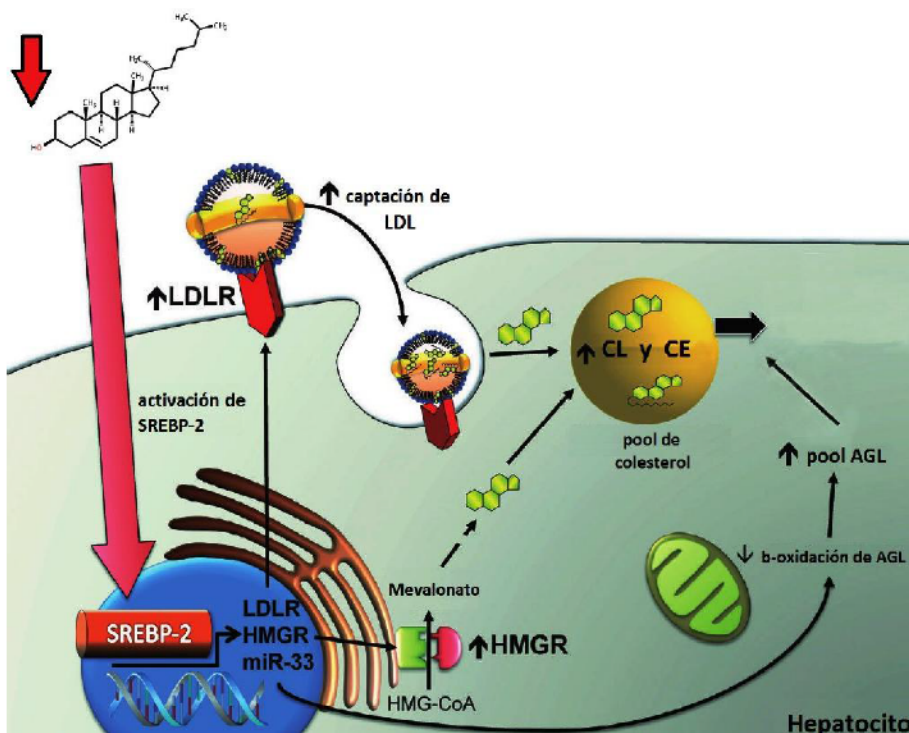


Figura 5.20. Activación de la expresión de genes regulados por SREBP-2 en respuesta a niveles bajos de colesterol intracelular. Niveles bajos de colesterol promueven la activación proteolítica de SREBP-2. El factor maduro trasloca al núcleo y activa la transcripción de genes involucrados en la síntesis (HMGR) y captación extracelular (LDLR) de colesterol y de genes que incrementan la disponibilidad del pool de AGL (miR-33). La acción

conjunta de estos 3 mecanismos compensatorios incrementa los niveles intracelulares de colesterol y su almacenamiento en forma de CE (Adaptado de Van Rooyen 2011).

Como se demostró en la sección 5.2.3.2, ambos monoterpenos inhibieron la incorporación de ^{14}C -acetato en CE y en CL. Cabe mencionar que mientras los niveles de ^{14}C -CL disminuyeron un 50% para el tratamiento con linalool 750 μM respecto al de 400 μM , la radiactividad incorporada en CE se mantuvo constante. Tal vez este fenómeno sea consecuencia de un aumento en la esterificación del CL en respuesta a la inhibición de su síntesis, como se propone en la figura 5.20.

Trabajos realizados en modelos animales y celulares de hiperlipemia con aceites esenciales conteniendo linalool y/o 1,8-cineole como principales componentes describen que

estos aceites son efectivos en la prevención de la oxidación de lipoproteínas, la disminución de los niveles de colesterol y TAG séricos y el mejoramiento del perfil lipídico en general (Chithra et al. 1997; Khan et al. 2009; Cho 2012). En nuestro modelo experimental, el contenido de FLT y TAG en las células HepG2 no se vio afectado significativamente por ninguno de estos isoprenoides a pesar de la moderada reducción en la incorporación de acetato en FLT a concentraciones elevadas de 1,8-cineole, y del aumento pronunciado en la incorporación de marca radiactiva en FLT y TAG para los tratamientos con linalool.

Linalool y 1,8-cineole presentaron un efecto anticolesterogénico sinérgico en ambas líneas celulares que podría explicarse por el hecho de que cada uno de ellos afecta la VM a distintos niveles. Además se observó que la combinación de concentraciones de los monoterpenos que individualmente no afectan (LN 200 μM y CN 750 μM) provocan una disminución del 20% en los niveles de la enzima ($p=0,051$), siendo ésta otra de las razones por las cuales se produce el efecto sinérgico anticolesterogénico al combinar ambos isoprenoides.

La disminución de la incorporación de marca radiactiva en LIT registrada cuando ambos tipos celulares son tratados con una combinación de los dos monoterpenos sería una consecuencia directa de la caída abrupta de la incorporación en colesterol, lípido que en condiciones normales alberga entre el 40 y 50% de la marca total de la fracción insaponificable. Sin embargo, estos tratamientos no alteraron los niveles del contenido de colesterol en ninguno de los dos modelos celulares, lo que probablemente se deba a mecanismos compensatorios como los discutidos anteriormente.

En las condiciones experimentales empleadas, se requirió una concentración de simvastatina de 0,3 μM para inhibir un 50% la colesterogénesis en las células HepG2, similares a las reportadas en otros trabajos (Scharnagl et al. 2001) y a las alcanzadas en plasma durante los tratamientos de hipercolesterolemia (Bonetti et al. 2003). Se requirió una concentración 7 a 10 veces mayor de simvastatina para inhibir un 50% la colesterogénesis en células A549, lo que puede ser atribuido a la menor actividad colesterogénica de las células extra-hepáticas o algún tipo de hepatoselectividad para la simvastatina. Dado que las estatinas inhiben la VM en una etapa temprana, además de la inhibición de la síntesis de colesterol, provocan la disminución de intermediarios y productos de la vía como escualeno, lanosterol y ubiquinona. La deficiencia de

esta última se asocia al debilitamiento muscular y rhabdomiolisis producida por los tratamientos con estatinas (Baker et al. 2001; Antons et al. 2006; Tavintharan et al. 2007; Holbrook et al. 2011). Además, la disminución de los niveles de colesterol se traduce en un incremento de la expresión de la HMGCR mediada por SREBP-2 (Goldstein et al. 2006) y en consecuencia la efectividad de la estatina se ve reducida, generando la necesidad de utilizar dosis cada vez mayores para mantener el efecto hipocolesterolemizante (Reihner et al. 1990; Staedler et al. 2012).

Las combinaciones entre isoprenoides y simvastatina inhibieron sinérgicamente la colesterogénesis excepto para el caso particular de la combinación entre 1,8-cineole y simvastatina en A549 donde la interacción fue más bien de tipo aditiva ($R=0,97$). Cabe destacar que la caída abrupta de la síntesis de ubiquinona provocada por simvastatina en células HepG2 fue revertida a niveles próximos al de las células control cuando fueron co-incubadas con linalool o 1,8-cineole. Por otra parte, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, pudo apreciarse cómo la presencia de linalool revierte el aumento de los niveles de HMGCR inducido por simvastatina, lo cual mejoraría la eficacia de la estatina. Esta podría ser una de las razones del efecto sinérgico anticolesterogénico de la interacción entre ambos. La normalización de los niveles de ubiquinona y de la propia HMGCR sugiere que los tratamientos combinados podrían ser efectivos para reducir o eliminar los efectos secundarios y la tolerancia provocados por la terapia con estatinas.

En células HepG2, los tratamientos combinados de cada monoterpeno con simvastatina provocaron una disminución significativa del contenido de colesterol. Tal vez esto se deba a que, a pesar de la presencia de mecanismos que promuevan la captación de colesterol extracelular, la disponibilidad de esteroides en el medio haya resultado insuficiente para compensar los niveles de colesterol intracelular.

Por esta y otras razones mencionadas anteriormente, es evidente la necesidad de ampliar el estudio del metabolismo lipídico en otras condiciones, a otros tiempos y concentraciones para profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados y determinar las combinaciones que resulten más adecuadas.

Capítulo 6

CONCLUSIONES FINALES

En esta tesis, a partir de experimentos diseñados para cumplir con los objetivos propuestos que intentan reforzar o refutar las hipótesis planteadas, hemos evaluado los efectos y mecanismos de acción de los monoterpenos linalool y 1,8-cineole (administrados solos, combinados entre sí o cada uno con simvastatina) en células tumorales humanas HepG2 (modelo de célula hepática) y A549 (modelo de célula extra-hepática). Los resultados de los experimentos realizados permiten confirmar las hipótesis planteadas y concluir que:

- **Linalool y 1,8-cineole ejercen un efecto anticolesterogénico no hepatoselectivo a concentraciones que no afectan la proliferación celular.** Los IC50sc para cada uno de ellos en ambas líneas celulares se encuentran en el rango de 350-550 μM aproximadamente, de modo que presentan una efectividad similar y no hepatoselectiva. Ambos monoterpenos inhiben la síntesis de colesterol hasta un 90% sin afectar la viabilidad en los dos modelos celulares.
- **A partir de concentraciones anticolesterogénicas bajas estos isoprenoides inhiben distintas etapas de la VM.** El linalool inhibiría alguna de las etapas de la conversión de lanosterol en colesterol mientras que el 1,8-cineole afectaría además la conversión de escualeno en lanosterol. Ambos isoprenoides producen un redireccionamiento del intermediario FPP (principal punto de la ramificación de la VM) hacia la síntesis de ubiquinona.
- **A partir de concentraciones anticolesterogénicas intermedias los dos monoterpenos inhiben la HMGCR en células HepG2 por un mecanismo diferente al de las estatinas.** Ambos isoprenoides producen una reducción de la cantidad de HMGCR en células HepG2. Esto podría ser el resultado de un efecto directo de los monoterpenos sobre la síntesis y/o degradación de la enzima o bien un efecto indirecto provocado por la acumulación de intermediarios como lanosterol y 24,25-EC que facilitan la degradación proteosomal de la reductasa. A concentraciones elevadas, estos isoprenoides ocasionan una disminución profunda en los niveles de HMGCR que se correlaciona con una reducción de la incorporación de acetato en LIT.

- **Linalool y 1,8-cineole son potenciales agentes hipocolesterolemiantes.** La inhibición de la síntesis de colesterol está asociada a mecanismos compensatorios que favorecen la internalización de colesterol extracelular, generalmente de LDL-C vía LDLR. Esto promueve una reducción de los niveles de colesterol plasmático, lo que constituye el mecanismo de acción tradicional de algunos fármacos hipocolesterolemiantes. Si bien no se ha estudiado el efecto de ambos monoterpenos sobre la expresión del LDLR y/o sobre la captación de colesterol por esta vía, el hecho de que los tratamientos no afectaran significativamente el contenido de colesterol, y que linalool haya promovido la incorporación de ^3H -colesterol desde concentraciones bajas, son indicios de la presencia de mecanismos que favorecerían la actividad hipolipemiente de estos compuestos.
- **La combinación entre ambos monoterpenos inhibe sinérgicamente la colesterogénesis permitiendo disminuir las dosis efectivas.** Este fenómeno se debería a que cada uno de ellos afecta diferentes etapas de la VM y a que potencian la disminución de los niveles de HMGCR.
- **La simvastatina inhibe la síntesis de colesterol a concentraciones que no afectan la proliferación celular siendo su eficiencia mayor en las células hepáticas.** El valor de $\text{IC}_{50\text{sc}}$ en las células HepG2 (del mismo orden de magnitud que las concentraciones alcanzadas en plasma durante los tratamientos de hipercolesterolemia) es unas 10 veces menor que en células A549, lo que indicaría una hepatoselectividad de la simvastatina.
- **La simvastatina inhibe la VM en una etapa temprana e incrementa los niveles de HMGCR en células HepG2 confirmando lo observado en otros modelos.** Este compuesto, al inhibir competitivamente a la HMGCR, provoca una disminución de la síntesis de colesterol, de intermediarios (escualeno, lanosterol) y de otros productos finales de la vía (ubiquinona). Además, ocasiona un incremento de los niveles de HMGCR.

- **La combinación de cada uno de los monoterpenos con simvastatina inhibe sinérgicamente la colesterogénesis permitiendo disminuir sus dosis efectivas.** Este efecto podría deberse a que los compuestos inhiben a la VM en distintas etapas y a la HMGCR por diferentes mecanismos. El co-tratamiento con monoterpenos parece atenuar el aumento de los niveles de HMGCR inducido por simvastatina, lo cual mejoraría la eficacia de la estatina. Los tratamientos combinados provocan un efecto inhibitorio equivalente al que se obtiene a partir de concentraciones entre 3 y 5 veces mayores de simvastatina utilizada como agente único.
- **El co-tratamiento con monoterpenos revierte la inhibición de la síntesis de ubiquinona provocada por simvastatina en células HepG2, lo cual disminuiría los efectos secundarios indeseables de las estatinas.**
- **Linalool y 1,8-cineole inhiben la viabilidad y proliferación celular en ambas líneas tumorales.** El linalool es el agente antiproliferativo más potente de los dos mientras que la efectividad de cada uno fue comparable en ambas líneas celulares.
- **El efecto antiproliferativo de ambos monoterpenos se alcanza con concentraciones muy superiores a las requeridas para que actúen como agentes anticolesterogénicos.** Para inhibir un 50% la proliferación se requieren concentraciones aproximadamente 3 veces mayores al IC50sc de linalool y entre 10 y 15 veces mayores al IC50sc de 1,8-cineole.
- **La inhibición de la HMGCR mediada por los monoterpenos no es, por sí sola, responsable del efecto antiproliferativo.** La adicción de mevalonato exógeno no revierte la inhibición de la proliferación mediada por ambos monoterpenos. De modo que, la actividad antiproliferativa de estos compuestos sería consecuencia del bloqueo de etapas posteriores de la VM, como por ejemplo la inhibición de la prenilación de proteínas de la superfamilia Ras.

- **La actividad antiproliferativa del linalool podría deberse a la inhibición de la prenilación de Ras.** En células HepG2 tratadas con linalool en condiciones en las cuales la proliferación está inhibida en un 50%, los niveles de Ras en membrana disminuyen a la mitad acumulándose esta proteína en citosol.
- **El arresto del ciclo celular en G0/G1 es uno de los mecanismos por los cuales ambos monoterpenos ejercen su efecto antiproliferativo.** Tanto linalool como 1,8-cineole provocan un arresto del ciclo celular en G0/G1 en ambos modelos tumorales. El arresto resulta más evidente en las células A549 que presentan un tiempo de duplicación menor al de las células HepG2 y podría estar asociado con la inhibición de la traslocación de Ras a membrana, la cual promueve la transición de G1 a S en el ciclo celular.
- **La inducción de apoptosis es otro de los mecanismos involucrados en la actividad antiproliferativa de estos isoprenoides.** En condiciones donde la proliferación está inhibida un 50%, se evidencia la presencia de marcadores apoptóticos en células HepG2 tratadas con linalool. A concentraciones mayores, ambos isoprenoides provocarían la muerte celular por apoptosis en los dos tipos celulares.
- **La combinación entre monoterpenos inhibe sinérgicamente la viabilidad y proliferación en ambos modelos celulares.** Múltiples combinaciones de a pares a distintas concentraciones de los isoprenoides resultan en un profundo efecto sinérgico antiproliferativo ($R \gg 1$).
- **La combinación de cada monoterpeno con la simvastatina presenta un efecto antiproliferativo sinérgico permitiendo reducir las concentraciones efectivas de la estatina.** Esto permitiría disminuir los efectos secundarios asociados al empleo de estatinas en el tratamiento del cáncer y fortalece el uso promisorio de las mismas como agentes quimioterapéuticos asociados a otros fármacos.

En función de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis, se propone un modelo del mecanismo a través del cual linalool y 1,8-cineole regulan la vía de mevalonato en células HepG2. El mismo se presenta en la figura 6.1.

Los resultados presentados a lo largo de este trabajo contribuyen a un mejor entendimiento de la acción de los componentes de aceites esenciales y su combinación con estatinas sobre una vía metabólica tan compleja como lo es la vía del mevalonato. Además sugieren que el uso individual de monoterpenos y aceites esenciales, y su combinación con estatinas, pueden aportar alternativas que resulten beneficiosas para la salud en el tratamiento del cáncer y/o enfermedades cardiovasculares.

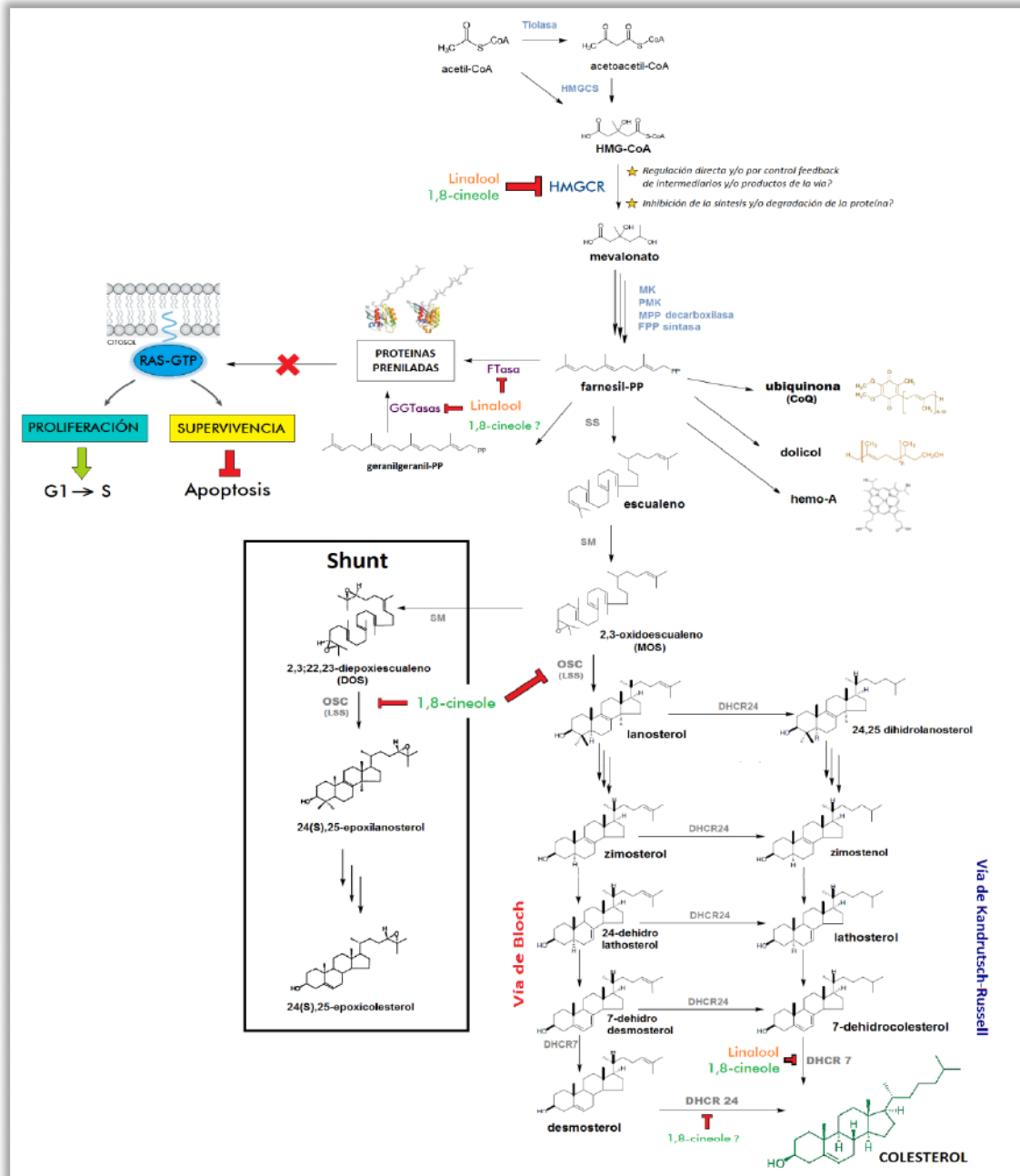


Figura 6. 1. Modelo propuesto para la regulación de la vía del mevalonato mediada por linalool y 1,8-cineole en células HepG2. A partir de concentraciones bajas de linalool y 1,8-cineole (no antiproliferativas) se produce una inhibición específica de la colesterogénesis, probablemente a nivel de la enzima DHCR7. Mientras linalool produce una acumulación de lanosterol, 1,8-cineole promueve una disminución del mismo y un aumento relativo de escualeno, posiblemente por inhibición parcial de la enzima OSC. Ambos isoprenoides producen un aumento en los niveles de ubiquinona. A concentraciones intermedias-altas (no antiproliferativas) ambos monoterpenos reducen los niveles de HMGCR provocando una profunda inhibición de la colesterogénesis. A concentraciones antiproliferativas, linalool inhibe la traslocación de Ras a membrana, lo que sugiere un efecto de este monoterpeno a nivel de las enzimas FTasa y/o GGTasas, induciendo el arresto del ciclo celular y muerte por apoptosis.

Apéndices

I. Determinación de la densidad celular óptima para sembrar al inicio de los experimentos

Estos ensayos se llevaron a cabo para determinar la densidad inicial óptima de células HepG2 y A549 a sembrar, según lo mencionado en la sección 3.3.3. Resumidamente, las células fueron sembradas a distintas densidades en un rango de $1,25 - 12,5 \times 10^3$ células/cm² en placas de 24 pocillos e incubadas en condiciones estándar durante 96 horas (últimas 24 horas en medio sin SFB) y se determinó la viabilidad celular por los métodos de MTT y RN. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron para la siembra inicial aquellas densidades que, luego de las 96 horas (el tiempo total de los tratamientos estándar de viabilidad), se encontraban en la zona lineal de las curvas de densidad óptica (DO) y por lo tanto no alcanzaron un 100% de confluencia (Figura 7.1). De este modo se sembraron 5×10^3 células A549/cm² y $7,5 \times 10^3$ células HepG2/cm².

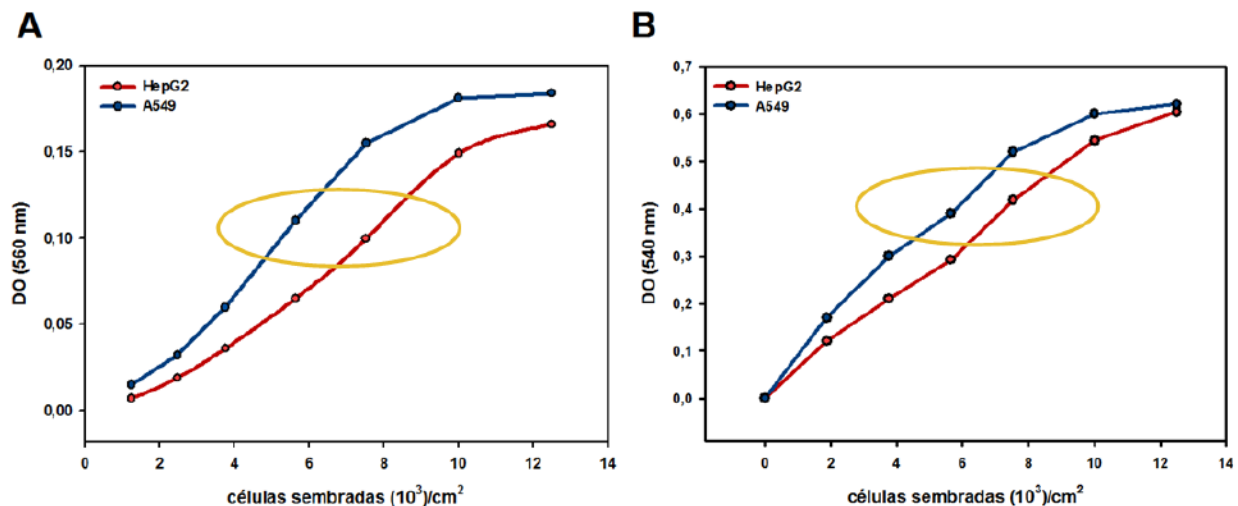


Figura 7. 1. Determinación de la densidad celular óptima para la siembra inicial de células HepG2 y A549. Ambas líneas celulares fueron sembradas a diferentes densidades entre $1,25 - 12,5 \times 10^3$ células/cm² en placas de 24 pocillos e incubadas en condiciones estándar durante 96 horas (últimas 24 horas en medio sin SFB). La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT (A) y Rojo Neutro (B) según lo descrito en las secciones 3.4.1 y 3.4.2. Con la elipse se señalan las concentraciones dentro de la zona de linealidad de las curvas de densidad óptica (DO) que fueron seleccionadas.

II. Valores de IC50 determinados a 24 y 48 horas en medio MEM suplementado con 10% SFB por el ensayo de MTT

Los cultivos celulares fueron incubados durante 48 horas en condiciones estándar hasta alcanzar fase exponencial de crecimiento, luego de lo cual el medio de cultivo se reemplazó por MEM fresco suplementado con 10% SFB y concentraciones crecientes de LN, CN o SV. Luego de 24 horas un lote de células fue cosechado (24 horas de tratamiento), mientras que a otro lote se le reemplazó el medio de cultivo por MEM fresco suplementado con 10% SFB y los compuestos correspondientes. Estas células se incubaron durante otras 24 horas (48 horas de tratamiento). La viabilidad y proliferación celular para cada lote fue determinada por el ensayo de MTT según lo descrito en la sección 3.4.1. Los resultados se muestran en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Valores de IC50 determinados a 24 y 48 horas en medio MEM suplementado con 10% SFB por el ensayo de MTT				
	HepG2		A549	
Linalool (μM)	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
0	100 \pm 6,9	100 \pm 6,4	100 \pm 6,8	100 \pm 6,0
500	ND	114,8 \pm 15,3	90,8 \pm 4,7	84,8 \pm 9,7
1000	99,3 \pm 8,3	88,0 \pm 6,5*	68,3 \pm 4,8***	52,8 \pm 4,8***
1500	95,4 \pm 6,2	72,6 \pm 10,5**	57,7 \pm 3,5***	34,2 \pm 2,1***
2000	92,8 \pm 14,7	34,0 \pm 8,1***	43,6 \pm 6,9***	19,4 \pm 1,7***
2500	78,0 \pm 12,0	21,1 \pm 9,9***	44,3 \pm 5,2***	5,6 \pm 2,2***
3000	35,3 \pm 18,2**	ND	ND	ND
IC50 (μM)	2870	1770	1660	1100
1,8-cineole (μM)	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
0	100 \pm 1,2	100 \pm 13,3	100 \pm 1,6	100 \pm 11,7
2000	ND	ND	97,3 \pm 7,7	103,5 \pm 3,5
4000	102,4 \pm 18,8	89,1 \pm 10,0	94,6 \pm 4,2	94,4 \pm 4,5
6000	94,0 \pm 10,3	73,0 \pm 4,9*	90,6 \pm 9,7	60,6 \pm 3,4**
8000	87,8 \pm 18,1	46,0 \pm 9,9**	75,7 \pm 4,4**	46,2 \pm 4,1***
10000	53,1 \pm 15,7**	33,4 \pm 2,5**	39,7 \pm 7,8***	28,8 \pm 0,8***
12000	19,4 \pm 13,4***	23,5 \pm 8,2***	ND	ND
IC50 (μM)	10170	7900	9300	7400
Simvastatina (μM)	24 hs	48 hs	24 hs	48 hs
0	100 \pm 8,8	100 \pm 11,3	100 \pm 12,6	100 \pm 5,6
5	97,4 \pm 9,1	91,7 \pm 6,8	94,8 \pm 8,5	94,4 \pm 1,9
10	80,5 \pm 10,5*	75,6 \pm 3,9*	83,6 \pm 13,4	92,2 \pm 7,6
20	62,0 \pm 6,3**	60,6 \pm 1,5***	58,3 \pm 6,0***	56,8 \pm 3,3***
40	52,1 \pm 8,2***	21,3 \pm 10,5***	47,2 \pm 3,7***	43,1 \pm 2,5***
80	43,7 \pm 5,6***	11,6 \pm 4,6***	42,5 \pm 2,9***	35,6 \pm 0,9***
IC50 (μM)	44,0	26,5	36,2	30,1

Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes de cada monoterpeno y de estatina durante 24 y 48 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT en las células HepG2 y A549. Los datos se expresan como el promedio \pm DS (n=4) respecto del control; *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001. ND: no determinado.

Referencias

- Acimovic, J. and D. Rozman (2013). "Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis." Molecules **18**(4): 4002-4017.
- Afshordel, S., B. Kern, et al. (2015). "Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation - Impact of Ras-/Rho-prenylation." Pharmacol Res **91**: 69-77.
- Ahearn, I. M., K. Haigis, et al. (2012). "Regulating the regulator: post-translational modification of RAS." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(1): 39-51.
- Ahern, T. P., L. Pedersen, et al. (2011). "Statin prescriptions and breast cancer recurrence risk: a Danish nationwide prospective cohort study." J Natl Cancer Inst **103**(19): 1461-1468.
- Anjum, R. and J. Blenis (2008). "The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(10): 747-758.
- Antons, K. A., C. D. Williams, et al. (2006). "Clinical perspectives of statin-induced rhabdomyolysis." Am J Med **119**(5): 400-409.
- Aprotosoaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., & Miron, A (2014). "Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties." Flavour and Fragrance Journal.
- Araki, M., M. Maeda, et al. (2012). "Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate." Eur J Pharmacol **674**(2-3): 95-103.
- Arunasree, K. M. (2010). "Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231." Phytomedicine **17**(8-9): 581-588.
- Aune, D., R. Lau, et al. (2011). "Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies." Gastroenterology **141**(1): 106-118.
- Bae, S. H. and Y. K. Paik (1997). "Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase." Biochem J **326** (Pt 2): 609-616.
- Baigent, C., A. Keech, et al. (2005). "Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins." Lancet **366**(9493): 1267-1278.
- Baker, S. K. and M. A. Tarnopolsky (2001). "Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives." Clin Invest Med **24**(5): 258-272.
- Bar-Sagi, D. and A. Hall (2000). "Ras and Rho GTPases: a family reunion." Cell **103**(2): 227-238.
- Bardon, S., V. Foussard, et al. (2002). "Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression." Cancer Lett **181**(2): 187-194.
- Bardou, M., A. Barkun, et al. (2010). "Effect of statin therapy on colorectal cancer." Gut **59**(11): 1572-1585.
- Barter, P. (2011). "HDL-C: role as a risk modifier." Atheroscler Suppl **12**(3): 267-270.
- Beau-Faller, M., M. Legrain, et al. (2009). "Detection of K-Ras mutations in tumour samples of patients with non-small cell lung cancer using PNA-mediated PCR clamping." Br J Cancer **100**(6): 985-992.
- Bengoechea-Alonso, M. T. and J. Ericsson (2007). "SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 215-222.

- Bennis, F., G. Favre, et al. (1993). "Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549." Int J Cancer 55(4): 640-645.
- Bentinger, M., M. Tekle, et al. (2010). "Coenzyme Q--biosynthesis and functions." Biochem Biophys Res Commun 396(1): 74-79.
- Beytia, E. D. and J. W. Porter (1976). "Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis." Annu Rev Biochem 45: 113-142.
- Bharate, S. B., B. Singh, et al. (2012). "Modulation of k-Ras signaling by natural products." Curr Med Chem 19(14): 2273-2291.
- Block, G., B. Patterson, et al. (1992). "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence." Nutr Cancer 18(1): 1-29.
- Bloch, K. (1952). "Biological synthesis of cholesterol." Harvey Lect 48: 68-88.
- Bloch, K. (1965). "The biological synthesis of cholesterol." Science 150(3692): 19-28.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, et al. (2003). "Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?" Eur Heart J 24(3): 225-248.
- Borenfreund, E. and J. A. Puerner (1985). "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption." Toxicol Lett 24(2-3): 119-124.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Brown, A. J. (2009). "24(S),25-epoxycholesterol: a messenger for cholesterol homeostasis." Int J Biochem Cell Biol 41(4): 744-747.
- Brown, M. S., S. E. Dana, et al. (1973). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Solubilization and purification of a cold-sensitive microsomal enzyme." J Biol Chem 248(13): 4731-4738.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell 89(3): 331-340.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." Proc Natl Acad Sci U S A 96(20): 11041-11048.
- Brugts, J. J., T. Yetgin, et al. (2009). "The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials." BMJ 338: b2376.
- Bryan, B. A. and P. A. D'Amore (2007). "What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis." Cell Mol Life Sci 64(16): 2053-2065.
- Buhaescu, I. and H. Izzedine (2007). "Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications." Clin Biochem 40(9-10): 575-584.
- Burg, J. S. and P. J. Espenshade (2011). "Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast." Prog Lipid Res 50(4): 403-410.
- Burns, E. M. (2009). "Simvastatin treatment modulates the immune response, increasing the survival of mice infected with *Staphylococcus Aureus*. A Thesis submitted to the graduate school (Doctoral dissertation, Ball State University)."
- Cal, K. and M. Krzyzaniak (2006). "Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans." J Dermatol Sci 42(3): 265-267.

- Campbell, M. J., L. J. Esserman, et al. (2006). "Breast cancer growth prevention by statins." Cancer Res **66**(17): 8707-8714.
- Cardozo, M. T., A. de Conti, et al. (2011). "Chemopreventive effects of beta-ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA." J Nutr Biochem **22**(2): 130-135.
- Clendening, J. W., A. Pandya, et al. (2010). "Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15051-15056.
- Cortes, V. A., D. Busso, et al. (2013). "Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol." Biol Rev Camb Philos Soc **88**(4): 825-843.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2003). "The dark side of Ras: regulation of apoptosis." Oncogene **22**(56): 8999-9006.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2010). "Ras history: The saga continues." Small Gtpases **1**(1): 2-27.
- Crespo, R., S. Montero Villegas, et al. (2013). "Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways." Biochem Cell Biol **91**(3): 131-139.
- Crowell, P. L., R. R. Chang, et al. (1991). "Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites." J Biol Chem **266**(26): 17679-17685.
- Crowell, P. L., Z. Ren, et al. (1994). "Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation." Biochem Pharmacol **47**(8): 1405-1415.
- Cuello, M., S. Kato, et al. (2013). "Efectos de las estatinas en cáncer: ¿ potencial rol en terapéutica y prevención? ." Revista médica de Chile **141**(2): 227-236.
- Cha, J. D., Y. H. Kim, et al. (2010). "Essential Oil and 1,8-Cineole from Artemisia lavandulaefolia Induces Apoptosis in KB Cells via Mitochondrial Stress and Caspase Activation." Food Sci. Biotechnol **19**(1): 185-191.
- Chang, F., L. S. Steelman, et al. (2003). "Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)." Int J Oncol **22**(3): 469-480.
- Chang, T. Y., C. C. Chang, et al. (2006). "Cholesterol sensing, trafficking, and esterification." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 129-157.
- Chaudhary, S. C., M. S. Siddiqui, et al. (2012). "D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis." Hum Exp Toxicol **31**(8): 798-811.
- Chaudhary, S. C., M. S. Siddiqui, et al. (2013). "Geraniol inhibits murine skin tumorigenesis by modulating COX-2 expression, Ras-ERK1/2 signaling pathway and apoptosis." J Appl Toxicol **33**(8): 828-837.
- Chen, F., D. Tholl, et al. (2011). "The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom." Plant J **66**(1): 212-229.
- Chen, J., H. Bi, et al. (2013). "Atorvastatin overcomes gefitinib resistance in KRAS mutant human non-small cell lung carcinoma cells." Cell Death Dis **4**: e814.
- Chen, P. S., T. Y. Toribara, et al. (1956). "Microdetermination of Phosphorus." Analytical Chemistry **28**(11): 1756-1758.
- Chithra, V. and S. Leelamma (1997). "Hypolipidemic effect of coriander seeds (Coriandrum sativum): mechanism of action." Plant Foods Hum Nutr **51**(2): 167-172.

- Cho, K. H. (2012). "1,8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebrafish." BMB Rep 45(10): 565-570.
- Chou, J. Y., S. Y. Lai, et al. (2003). "Investigation of anticancer mechanism of thiadiazole-based compound in human non-small cell lung cancer A549 cells." Biochem Pharmacol 66(1): 115-124.
- Christie, W. W. (1982). "Lipid analysis." Oxford: Pergamon Press 338.
- Chung, M. J., K. W. Park, et al. (2008). "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." Br J Nutr 99(1): 67-75.
- DeBose-Boyd, R. A. (2008). "Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase." Cell Res 18(6): 609-621.
- Doll-Boscardin, P. M., A. Sartoratto, et al. (2012). "In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines." Evid Based Complement Alternat Med 2012: 342652.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer 3(1): 11-22.
- Duisken, M., F. Sandner, et al. (2005). "Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: identification of a new hydroxylated metabolite." Biochim Biophys Acta 1722(3): 304-311.
- Duncan, R. E., D. Lau, et al. (2004). "Geraniol and beta-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 Pharmacol 68(9): 1739-1747.
- El-Serag, H. B., M. L. Johnson, et al. (2009). "Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular carcinoma in a large cohort of patients with diabetes." Gastroenterology 136(5): 1601-1608.
- Endo, A., M. Kuroda, et al. (1976a). "Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity." FEBS Lett 72(2): 323-326.
- Endo, A., M. Kuroda, et al. (1976b). "ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*." J Antibiot (Tokyo) 29(12): 1346-1348.
- Engelking, L. J., G. Liang, et al. (2005). "Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins." J Clin Invest 115(9): 2489-2498.
- Espenshade, P. J. (2006). "SREBPs: sterol-regulated transcription factors." J Cell Sci 119(Pt 6): 973-976.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature 420(6916): 629-635.
- Fernandes, N. V., P. K. Guntipalli, et al. (2010). "d-delta-Tocotrienol-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells." Anticancer Res 30(12): 4937-4944.
- Fisher, E. A., J. E. Feig, et al. (2012). "High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport." Arterioscler Thromb Vasc Biol 32(12): 2813-2820.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem 226(1): 497-509.
- Foster, K. A., C. G. Oster, et al. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." Exp Cell Res 243(2): 359-366.
- Friesen, J. A. and V. W. Rodwell (2004). "The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases." Genome Biol 5(11): 248.

- Funatsu, T., K. Suzuki, et al. (2001). "Prolonged inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin inhibits apo B-100 and triglyceride secretion from HepG2 cells." *Atherosclerosis* **157**(1): 107-115.
- Galle, M., R. Crespo, et al. (2014). "Suppression by geraniol of the growth of a549 human lung adenocarcinoma cells and inhibition of the mevalonate pathway in culture and in vivo: potential use in cancer chemotherapy." *Nutr Cancer* **66**(5): 888-895.
- Gaw, A. (2003). "HDL-C and triglyceride levels: relationship to coronary heart disease and treatment with statins." *Cardiovasc Drugs Ther* **17**(1): 53-62.
- Gazzerro, P., M. C. Proto, et al. (2012). "Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer." *Pharmacol Rev* **64**(1): 102-146.
- Gelb, M. H., F. Tamanoi, et al. (1995). "The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol." *Cancer Lett* **91**(2): 169-175.
- Gerin, I., L. A. Clerbaux, et al. (2010). "Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation." *J Biol Chem* **285**(44): 33652-33661.
- Ghittoni, R., L. Patrussi, et al. (2005). "Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases." *FASEB J* **19**(6): 605-607.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, et al. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1417-1423.
- Gilardon, E. O. A. (2005). "De Karelia a Jovita y Rosario en Argentina." *Arch. argent. pediatr* **103**(4): 291-292.
- Goc, A., S. T. Kochuparambil, et al. (2012). "Simultaneous modulation of the intrinsic and extrinsic pathways by simvastatin in mediating prostate cancer cell apoptosis." *BMC Cancer* **12**: 409.
- Goedeke, L. and C. Fernandez-Hernando (2012). "Regulation of cholesterol homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **69**(6): 915-930.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* **343**(6257): 425-430.
- Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd, et al. (2006). "Protein sensors for membrane sterols." *Cell* **124**(1): 35-46.
- Gonyeau, M. J. and D. W. Yuen (2010). "A clinical review of statins and cancer: helpful or harmful?" *Pharmacotherapy* **30**(2): 177-194.
- Gorczyca, W., J. Gong, et al. (1993). "Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays." *Cancer Res* **53**(8): 1945-1951.
- Group, S. S. S. (1994). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." *Lancet* **344**(8934): 1383-1389.
- Gruenbacher, G. and M. Thurnher (2015). "Mevalonate metabolism in cancer." *Cancer Lett* **356**(2 Pt A): 192-196.
- Gu, Y., Z. Ting, et al. (2010). "Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors." *Toxicology* **268**(1-2): 19-24.
- Guimaraes, A. G., J. S. Quintans, et al. (2013). "Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review." *Phytother Res* **27**(1): 1-15.

- Gysin, S., M. Salt, et al. (2011). "Therapeutic strategies for targeting ras proteins." Genes Cancer 2(3): 359-372.
- Hamelin, B. A. and J. Turgeon (1998). "Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors." Trends Pharmacol Sci 19(1): 26-37.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.
- Hardcastle, I. R., M. G. Rowlands, et al. (1999). "Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene." Biochem Pharmacol 57(7): 801-809.
- Hardie, D. G., S. A. Hawley, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept." J Physiol 574(Pt 1): 7-15.
- Hindler, K., C. S. Cleeland, et al. (2006). "The role of statins in cancer therapy." Oncologist 11(3): 306-315.
- Hinson, D. D., K. L. Chambliss, et al. (1997). "Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways." J Lipid Res 38(11): 2216-2223.
- Holbrook, A., M. Wright, et al. (2011). "Statin-associated rhabdomyolysis: is there a dose-response relationship?" Can J Cardiol 27(2): 146-151.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, et al. (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest 109(9): 1125-1131.
- Hsu, Y. L., P. L. Kuo, et al. (2004). "Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells." Life Sci 75(19): 2303-2316.
- Huang, C. and C. Freter (2015). "Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy." Int J Mol Sci 16(1): 924-949.
- Hwang, K. E., K. S. Na, et al. (2011). "Apoptotic induction by simvastatin in human lung cancer A549 cells via Akt signaling dependent down-regulation of survivin." Invest New Drugs 29(5): 945-952.
- Ikonen, E. (2006). "Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease." Physiol Rev 86(4): 1237-1261.
- Ikonen, E. (2008). "Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization." Nat Rev Mol Cell Biol 9(2): 125-138.
- Islam, M., S. Sharma, et al. (2013). "Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis." Oral Oncol 49(8): 778-786.
- Istvan, E. S. and J. Deisenhofer (2001). "Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase." Science 292(5519): 1160-1164.
- Jacobs, E. J., C. Rodriguez, et al. (2006). "Cholesterol-lowering drugs and colorectal cancer incidence in a large United States cohort." J Natl Cancer Inst 98(1): 69-72.
- Jakobisiak, M. and J. Golab (2010). "Statins can modulate effectiveness of antitumor therapeutic modalities." Med Res Rev 30(1): 102-135.
- Jana, S., K. Patra, et al. (2014). "Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: an in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model." Nutr Cancer 66(5): 835-848.
- Javitt, N. B. (1990). "Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids." FASEB J 4(2): 161-168.

- Jia, S. S., G. P. Xi, et al. (2013). "Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells." *Oncol Rep* **29**(1): 349-354.
- Jiang, P., R. Mukthavaram, et al. (2014). "In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells." *Br J Cancer* **111**(8): 1562-1571.
- Jo, Y. and R. A. Debose-Boyd (2010). "Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**(3): 185-198.
- Jones, M. B., J. N. Rosenberg, et al. (2009). "Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life." *Biochim Biophys Acta* **1790**(6): 485-494.
- Jones, S., N. V. Fernandes, et al. (2013). "beta-ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells." *Nutr Cancer* **65**(4): 600-610.
- Jun, H. J., M. H. Hoang, et al. (2013). "Induction of ABCA1 and ABCG1 expression by the liver X receptor modulator cineole in macrophages." *Bioorg Med Chem Lett* **23**(2): 579-583.
- Jung, D. H. (1973). "Method for the quantitative determination of cholesterol." U.S. Patent No. 3,736,340.
- Kaefer, C. M. and J. A. Milner (2008). "The role of herbs and spices in cancer prevention." *J Nutr Biochem* **19**(6): 347-361.
- Kah, J., A. Wustenberg, et al. (2012). "Selective induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitors in hepatoma cells and dependence on p53 expression." *Oncol Rep* **28**(3): 1077-1083.
- Kaminsky, Y. G. and E. A. Kosenko (2010). "Molecular mechanisms of toxicity of simvastatin, widely used cholesterol-lowering drug. A review. ." *Central European Journal of Medicine* **5**(3): 269-279.
- Kandutsch, A. A. and A. E. Russell (1960). "Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol." *J Biol Chem* **235**: 2256-2261.
- Karagianni, P. and I. Talianidis (2015). "Transcription factor networks regulating hepatic fatty acid metabolism." *Biochim Biophys Acta* **1851**(1): 2-8.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 517-531.
- Kato, K., A. D. Cox, et al. (1992). "Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(14): 6403-6407.
- Keaney, J. F., Jr., G. D. Curfman, et al. (2014). "A pragmatic view of the new cholesterol treatment guidelines." *N Engl J Med* **370**(3): 275-278.
- Kearney, P. M., L. Blackwell, et al. (2008). "Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis." *Lancet* **371**(9607): 117-125.
- Kern, D. H., C. R. Morgan, et al. (1988). "In vitro pharmacodynamics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine: synergy of antitumor activity with cis-diamminedichloroplatinum(II)." *Cancer Res* **48**(1): 117-121.
- Khan, A., K. Vaibhav, et al. (2014). "1,8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease." *Neurochem Res* **39**(2): 344-352.
- Khan, A., G. Zaman, et al. (2009). "Bay leaves improve glucose and lipid profile of people with type 2 diabetes." *J Clin Biochem Nutr* **44**(1): 52-56.
- Khurana, V., H. R. Bejjanki, et al. (2007). "Statins reduce the risk of lung cancer in humans: a large case-control study of US veterans." *Chest* **131**(5): 1282-1288.

- Kim, S. H., E. J. Park, et al. (2012). "Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells." *Int J Oncol* **40**(5): 1683-1690.
- Kirsh, V. A., U. Peters, et al. (2007). "Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **99**(15): 1200-1209.
- Knowles, B. B., C. C. Howe, et al. (1980). "Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen." *Science* **209**(4455): 497-499.
- Kochuparambil, S. T., B. Al-Husein, et al. (2011). "Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression." *J Pharmacol Exp Ther* **336**(2): 496-505.
- Konstantinopoulos, P. A., M. V. Karamouzis, et al. (2007). "Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets." *Nat Rev Drug Discov* **6**(7): 541-555.
- Kumar, A. S., C. C. Benz, et al. (2008). "Estrogen receptor-negative breast cancer is less likely to arise among lipophilic statin users." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(5): 1028-1033.
- Kuroda, M., Y. Tsujita, et al. (1979). "Hypolipidemic effects in monkeys of ML-236B, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase." *Lipids* **14**(6): 585-589.
- Kwan, M. L., L. A. Habel, et al. (2008). "Post-diagnosis statin use and breast cancer recurrence in a prospective cohort study of early stage breast cancer survivors." *Breast Cancer Res Treat* **109**(3): 573-579.
- Lapczynski, A., C. S. Letizia, et al. (2008). "Addendum to Fragrance material review on linalool." *Food Chem Toxicol* **46 Suppl 11**: S190-192.
- Larsson, O. (1996). "HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells." *Crit Rev Oncol Hematol* **22**(3): 197-212.
- Li, N., H. Fu, et al. (2009a). "miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells." *Cancer Lett* **275**(1): 44-53.
- Li, Y., C. M. Yeung, et al. (2009b). "Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, *Schefflera heptaphylla*." *Phytotherapy Research*, **23**(1): 140-142.
- Liao, J. K. and U. Laufs (2005). "Pleiotropic effects of statins." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 89-118.
- Lin, H. M., H. C. Tseng, et al. (2007). "Induction of autophagy and apoptosis by the extract of *Solanum nigrum* Linn in HepG2 cells." *J Agric Food Chem* **55**(9): 3620-3628.
- Listenberger, L. L., X. Han, et al. (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3077-3082.
- Liu, Q., H. W. Dong, et al. (2013). "Apoptosis initiation of beta-ionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway." *Arch Toxicol* **87**(3): 481-490.
- López Alcalá, C. (2006). "Regulación de K-Ras por Ca²⁺/CaM." *Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona, España*.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Maksimova, E., T. A. Yie, et al. (2008). "In vitro mechanisms of lovastatin on lung cancer cell lines as a potential chemopreventive agent." *Lung* **186**(1): 45-54.

- Manassero, C. A., J. R. Girotti, et al. (2013). "In vitro comparative analysis of antiproliferative activity of essential oil from mandarin peel and its principal component limonene." Nat Prod Res 27(16): 1475-1478.
- Marco, C., J. M. Jimenez-Lopez, et al. (2009). "Hexadecylphosphocholine alters nonvesicular cholesterol traffic from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum and inhibits the synthesis of sphingomyelin in HepG2 cells." Int J Biochem Cell Biol 41(6): 1296-1303.
- McAnally, J. A., J. Gupta, et al. (2007). "Tocotrienols potentiate lovastatin-mediated growth suppression in vitro and in vivo." Exp Biol Med (Maywood) 232(4): 523-531.
- McGarvey, D. J. and R. Croteau (1995). "Terpenoid metabolism." Plant Cell 7(7): 1015-1026.
- McTaggart, S. J. (2006). "Isoprenylated proteins." Cell Mol Life Sci 63(3): 255-267.
- Mills, J. J., R. S. Chari, et al. (1995). "Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol." Cancer Res 55(5): 979-983.
- Mo, H. and C. E. Elson (2004). "Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention." Exp Biol Med (Maywood) 229(7): 567-585.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.
- Mullen, P. J., B. Luscher, et al. (2010). "Effect of simvastatin on cholesterol metabolism in C2C12 myotubes and HepG2 cells, and consequences for statin-induced myopathy." Biochem Pharmacol 79(8): 1200-1209.
- Murata, S., R. Shiragami, et al. (2013). "Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer." Oncol Rep 30(6): 2647-2652.
- Nguyen, K. C., W. G. Willmore, et al. (2013). "Cadmium telluride quantum dots cause oxidative stress leading to extrinsic and intrinsic apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells." Toxicology 306: 114-123.
- Notas, G., A. P. Nifli, et al. (2006). "Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation." Biochim Biophys Acta 1760(11): 1657-1666.
- Ong, T. P., R. Heidor, et al. (2006). "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.
- Osmak, M. (2012). "Statins and cancer: current and future prospects." Cancer Lett 324(1): 1-12.
- Oxford, G. and D. Theodorescu (2003). "Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility." Cancer Lett 189(2): 117-128.
- Palozza, P., M. Colangelo, et al. (2010). "Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines." Carcinogenesis 31(10): 1813-1821.
- Papucci, L., N. Schiavone, et al. (2003). "Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property." J Biol Chem 278(30): 28220-28228.
- Pastori, D., L. Polimeni, et al. (2015). "The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease." Dig Liver Dis 47(1): 4-11.

- Peffley, D. M. and A. K. Gayen (2003). "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.
- Pisanti, S., P. Picardi, et al. (2014). "Novel prospects of statins as therapeutic agents in cancer." Pharmacol Res **88**: 84-98.
- Polo, M. and M. G. de Bravo (2001). "Simvastatin effects on a human lung carcinoma and cholesterol homeostasis of host and non-host mice." Arch Physiol Biochem **109**(5): 435-440.
- Polo, M. P. and M. G. de Bravo (2006). "Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2." Biochem Cell Biol **84**(1): 102-111.
- Polo, M. P., M. G. de Bravo, et al. (2003). "Effect of ethanol on cell growth and cholesterol metabolism in cultured Hep G2 cells." Biochem Cell Biol **81**(6): 379-386.
- Popjak, G., W. S. Goodman, et al. (1961). "Studies on the biosynthesis of cholesterol. XV. Mechanism of squalene biosynthesis from farnesyl pyrophosphate and from mevalonate." J Biol Chem **236**: 1934-1947.
- Portincasa, P., A. Moschetta, et al. (2006). "Cholesterol gallstone disease." Lancet **368**(9531): 230-239.
- Poynter, J. N., S. B. Gruber, et al. (2005). "Statins and the risk of colorectal cancer." N Engl J Med **352**(21): 2184-2192.
- Pramfalk, C., Z. Y. Jiang, et al. (2010). "HNF1alpha and SREBP2 are important regulators of NPC1L1 in human liver." J Lipid Res **51**(6): 1354-1362.
- Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka, et al. (2011). "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web." Nat Rev Cancer **11**(11): 761-774.
- Raghow, R., C. Yellaturu, et al. (2008). "SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis." Trends Endocrinol Metab **19**(2): 65-73.
- Ravizza, R., M. B. Gariboldi, et al. (2008). "Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells." Oncol Rep **20**(3): 625-630.
- Reihner, E., M. Rudling, et al. (1990). "Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol." N Engl J Med **323**(4): 224-228.
- Relja, B., F. Meder, et al. (2010). "Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells." Int J Mol Med **26**(5): 735-741.
- Ren, Z., C. E. Elson, et al. (1997). "Inhibition of type I and type II geranylgeranyl-protein transferases by the monoterpene perillyl alcohol in NIH3T3 cells." Biochem Pharmacol **54**(1): 113-120.
- Ren, Z. and M. N. Gould (1994). "Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol." Cancer Lett **76**(2-3): 185-190.
- Resh, M. D. (2012). "Targeting protein lipidation in disease." Trends Mol Med **18**(4): 206-214.
- Richards, C. A., S. A. Short, et al. (1990). "Characterization of a transforming N-ras gene in the human hepatoma cell line Hep G2: additional evidence for the importance of c-myc and ras cooperation in hepatocarcinogenesis." Cancer Res **50**(5): 1521-1527.
- Roberts, P. J., N. Mitin, et al. (2008). "Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification." J Biol Chem **283**(37): 25150-25163.
- Rodriguez-Concepcion, M. (2014). "Plant isoprenoids: a general overview." Methods Mol Biol **1153**: 1-5.

- Ros, E. (2003). "Inhibición de la absorción intestinal del colesterol: nueva diana terapéutica en la reducción de la colesterolemia." Clin Invest Arterioscl **15**(6): 261-275.
- Rosenson, R. S. (2004). "Current overview of statin-induced myopathy." Am J Med **116**(6): 408-416.
- Rowe, A. H., C. A. Argmann, et al. (2003). "Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation." Circ Res **93**(8): 717-725.
- Roy, M., H. J. Kung, et al. (2011). "Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins." Am J Cancer Res **1**(4): 542-561.
- Rueff, J., C. Chiapella, et al. (1996). "Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays." Mutat Res **353**(1-2): 151-176.
- Saavedra, O. M., I. R. Sánchez, et al. (2012). "Cholesterol: Biological function and medical implications " Rev Mex Cienc Farm, **43**(2): 7-22.
- Sabri, M. and R. L. Macdonald (2010). "Statins: a potential therapeutic addition to treatment for aneurysmal subarachnoid hemorrhage?" World Neurosurg **73**(6): 646-653.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2002). "RHO-GTPases and cancer." Nat Rev Cancer **2**(2): 133-142.
- Sakakura, Y., H. Shimano, et al. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis." Biochem Biophys Res Commun **286**(1): 176-183.
- Salaun, C., J. Greaves, et al. (2010). "The intracellular dynamic of protein palmitoylation." J Cell Biol **191**(7): 1229-1238.
- Santarpia, L., S. M. Lippman, et al. (2012). "Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy." Expert Opin Ther Targets **16**(1): 103-119.
- Santos, C. R. and A. Schulze (2012). "Lipid metabolism in cancer." FEBS J **279**(15): 2610-2623.
- Santos, F. A. and V. S. Rao (2000). "Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils." Phytother Res **14**(4): 240-244.
- Sassano, A., E. Katsoulidis, et al. (2007). "Suppressive effects of statins on acute promyelocytic leukemia cells." Cancer Res **67**(9): 4524-4532.
- Schaffer, J. E. (2003). "Lipotoxicity: when tissues overeat." Curr Opin Lipidol **14**(3): 281-287.
- Scharnagl, H., R. Schinker, et al. (2001). "Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells." Biochem Pharmacol **62**(11): 1545-1555.
- Schmelzer, C., I. Lindner, et al. (2007). "Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study." IUBMB Life **59**(10): 628-633.
- Schoenheimer, R. and F. & Breusch (1933). "Synthesis and destruction of cholesterol in the organism " Journal of Biological Chemistry **103**(2): 439-448.
- Schubert, S., K. Shannon, et al. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer **7**(4): 295-308.
- Schwartz, A. L., S. E. Fridovich, et al. (1981). "Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line." J Biol Chem **256**(17): 8878-8881.
- Sebti, S. M., G. T. Tkalcevic, et al. (1991). "Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice." Cancer Commun **3**(5): 141-147.

- Sfara, V., E. N. Zerba, et al. (2009). "Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*." J Med Entomol 46(3): 511-515.
- Shefer, S., G. Salen, et al. (1995). "Markedly inhibited 7-dehydrocholesterol-delta 7-reductase activity in liver microsomes from Smith-Lemli-Opitz homozygotes." J Clin Invest 96(4): 1779-1785.
- Shen, H. M. and P. Codogno (2011). "Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?" Autophagy 7(5): 457-465.
- Shi, J., J. Zhu, et al. (2013). "Mevalonate pathway is a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma." Tumour Biol 34(1): 429-435.
- Shimoyama, S. (2011). "Statins are logical candidates for overcoming limitations of targeting therapies on malignancy: their potential application to gastrointestinal cancers." Cancer Chemother Pharmacol 67(4): 729-739.
- Silva, J., W. Abebe, et al. (2003). "Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*." J Ethnopharmacol 89(2-3): 277-283.
- Singh, S., P. P. Singh, et al. (2013). "Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis." Gastroenterology 144(2): 323-332.
- Siperstein, M. D. and M. J. Guest (1960). "Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis." J Clin Invest 39: 642-652.
- Slebos, R. J., G. G. Habets, et al. (1991). "Allele-specific detection of K-ras oncogene expression in human non-small-cell lung carcinomas." Int J Cancer 48(1): 51-56.
- Song, B. L., N. B. Javitt, et al. (2005a). "Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol." Cell Metab 1(3): 179-189.
- Song, B. L., N. Sever, et al. (2005b). "Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase." Mol Cell 19(6): 829-840.
- Staedler, D., C. Chapuis-Bernasconi, et al. (2012). "Cytotoxic effects of combination of oxidosqualene cyclase inhibitors with atorvastatin in human cancer cells." J Med Chem 55(11): 4990-5002.
- Swanson, K. M. and R. J. Hohl (2006). "Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway." Curr Cancer Drug Targets 6(1): 15-37.
- Swiezewska, E. and W. Danikiewicz (2005). "Polyisoprenoids: structure, biosynthesis and function." Prog Lipid Res 44(4): 235-258.
- Sylvester, P. W. (2012). "Synergistic anticancer effects of combined gamma-tocotrienol with statin or receptor tyrosine kinase inhibitor treatment." Genes Nutr 7(1): 63-74.
- Tatman, D. and H. Mo (2002). "Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells." Cancer Lett 175(2): 129-139.
- Tavintharan, S., C. N. Ong, et al. (2007). "Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: a possible role in statin-induced hepatotoxicity?" Toxicol Appl Pharmacol 223(2): 173-179.
- Taylor, F., M. D. Huffman, et al. (2013). "Statins for the primary prevention of cardiovascular disease." Cochrane Database Syst Rev 1: CD004816.

- Thomas, S. R., J. Neuzil, et al. (1996). "Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation." Arterioscler Thromb Vasc Biol 16(5): 687-696.
- Thurnher, M., G. Gruenbacher, et al. (2013). "Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells." Biochim Biophys Acta 1831(6): 1009-1015.
- Thurnher, M., O. Nussbaumer, et al. (2012). "Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents." Clin Cancer Res 18(13): 3524-3531.
- Tran, U. C. and C. F. Clarke (2007). "Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes." Mitochondrion 7 Suppl: S62-71.
- Tuteja, S. and D. J. Rader (2014). "High-density lipoproteins in the prevention of cardiovascular disease: changing the paradigm." Clin Pharmacol Ther 96(1): 48-56.
- van der Velde, A. E., G. Brufau, et al. (2010). "Transintestinal cholesterol efflux." Curr Opin Lipidol 21(3): 167-171.
- van der Velde, A. E., C. L. Vrins, et al. (2007). "Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice." Gastroenterology 133(3): 967-975.
- van der Wulp, M. Y., H. J. Verkade, et al. (2013). "Regulation of cholesterol homeostasis." Mol Cell Endocrinol 368(1-2): 1-16.
- Van Rooyen, D. M. and G. C. Farrell (2011). "SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH." J Gastroenterol Hepatol 26(5): 789-792.
- Vance, D. E. and H. Van den Bosch (2000). "Cholesterol in the year 2000." Biochim Biophys Acta 1529(1-3): 1-8.
- Vinogradova, Y., C. Coupland, et al. (2011). "Exposure to statins and risk of common cancers: a series of nested case-control studies." BMC Cancer 11: 409.
- Vock, C., F. Doring, et al. (2008). "Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP." Cell Physiol Biochem 22(5-6): 515-524.
- Walker, K. and M. F. Olson (2005). "Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics." Curr Opin Genet Dev 15(1): 62-68.
- Wang, Y., Y. Huang, et al. (2012). "Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR." J Lipid Res 53(9): 1932-1943.
- Weingartner, O., D. Lutjohann, et al. (2010). "Relationship between cholesterol synthesis and intestinal absorption is associated with cardiovascular risk." Atherosclerosis 210(2): 362-365.
- Westover, E. J. and D. F. Covey (2004). "The enantiomer of cholesterol." J Membr Biol 202(2): 61-72.
- Wierzbicki, A. S., R. Poston, et al. (2003). "The lipid and non-lipid effects of statins." Pharmacol Ther 99(1): 95-112.
- Wilson, K. F., J. W. Erickson, et al. (2013). "Rho GTPases and their roles in cancer metabolism." Trends Mol Med 19(2): 74-82.
- Wiseman, D. A., S. R. Werner, et al. (2007). "Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells." J Pharmacol Exp Ther 320(3): 1163-1170.

- Wong, J., C. M. Quinn, et al. (2007). "Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol." Lipids Health Dis 6: 10.
- Wood, W. G., U. Igbavboa, et al. (2013). "Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection?" Mol Neurobiol 48(2): 308-314.
- Wu, C. S., Y. J. Chen, et al. (2012). "Terpinen-4-ol Induces Apoptosis in Human Nonsmall Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo." Evid Based Complement Alternat Med 2012: 818261.
www.deis.gov.ar (2014).
- Xu, J., Z. Q. Hu, et al. (2014). "Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice." Int J Clin Exp Pathol 7(4): 1495-1501.
- Xu, X., Y. Zhang, et al. (2011). "Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway." J Exp Clin Cancer Res 30: 33.
- Yamamoto, A., H. Sudo, et al. (1980). "Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia." Atherosclerosis 35(3): 259-266.
- Yamauchi, Y., P. C. Reid, et al. (2007). "Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols." J Biol Chem 282(48): 34994-35004.
- Yan, K., C. Zhang, et al. (2011). "Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells." Eur J Pharmacol 661(1-3): 1-7.
- Yang, C., J. G. McDonald, et al. (2006). "Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands." J Biol Chem 281(38): 27816-27826.
- Yu, L., S. Bharadwaj, et al. (2006). "Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake." J Biol Chem 281(10): 6616-6624.
- Yuri, T., N. Danbara, et al. (2004). "Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo." Breast Cancer Res Treat 84(3): 251-260.
- Yusuf, S. (2002). "Two decades of progress in preventing vascular disease." Lancet 360(9326): 2-3.
- Zerenturk, E. J., I. Kristiana, et al. (2012). "The endogenous regulator 24(S),25-epoxycholesterol inhibits cholesterol synthesis at DHCR24 (Seladin-1)." Biochim Biophys Acta 1821(9): 1269-1277.
- Zhang, F. and G. Du (2012). "Dysregulated lipid metabolism in cancer." World J Biol Chem 3(8): 167-174.
- Zhang, W. and W. Bai (2014). "MiR-21 suppresses the anticancer activities of curcumin by targeting PTEN gene in human non-small cell lung cancer A549 cells." Clin Transl Oncol 16(8): 708-713.
- Zhao, C. and K. Dahlman-Wright (2010). "Liver X receptor in cholesterol metabolism." J Endocrinol 204(3): 233-240.