



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

**Evaluación de potenciales  
propiedades antiaterogénicas y  
antitumorales del aceite de la cáscara  
de *Citrus reticulata***

---

**Tesista: Lic. María Agustina Castro**

**Directora: Dra. Margarita García de Bravo**

**Codirectora: Dra. Rosana Crespo**

**Año: 2019**

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 “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP) UNLP - CONICET CCT La Plata, bajo la dirección de la Dra. Margarita García de Bravo y la co-dirección de la Dra. Rosana Crespo.

## **Agradecimientos**

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haberme otorgado becas y subsidios que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de investigación.

- Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP) por brindarme el espacio para trabajar en estos años.

- A mis directoras Margarita y Rosana.

A Margarita por abrirme las puertas de su laboratorio y confiar en mí, por su constante apoyo e interés.

A Rosana por estar presente en todo momento, desde lo laboral así como también en lo personal. Por entenderme, transmitirme sus experiencias y enseñarme a mejorar día a día.

- A Boris, Nela y Sandra. Gracias por su compañerismo. Por siempre estar dispuestos a ayudarme en el trabajo, de cada uno de ustedes me llevo un gran aprendizaje. Y lo más importante, por convertirse en grandes amigos.

- A Moni H., por la linda relación que entablamos más allá del laboratorio, por preocuparse siempre por mí, por los mates y charlas compartidas.

- A toda la gente del cuarto piso, en especial a Gra, Santi y Marisa, que me han ayudado cuando lo he necesitado.

- A todas las personas del INIBIOLP que me han brindado su colaboración, ya sea con préstamo de equipos o reactivos, sugerencia de ideas o con trabajo en el laboratorio.

- A la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP por concederme un espacio para enseñar.

- A mis amigos, por apoyarme y alentarme. Gracias por regalarme sobrinos y un ahijado, a los que tanto quiero.

- A toda mi familia, por estar presente.

- A mis abuelos, por su ejemplo de lucha y perseverancia y por creer en mí.

- A mis papas, por permitirme crecer con libertad y guiarme en todos los momentos de mi vida.

- A mis hermanos, por el gran vínculo formado. Por estar siempre.

- A Gastón, por protegerme e incentivarme a mejorar. Por todos estos años compartidos, con sus buenos y malos momentos. Por alegrar todos mis días y brindarme su amor.

## Difusión de resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis han sido presentados en reuniones científicas y publicados en revistas científicas con referato.

### Publicaciones en revistas científicas con referato

- ***Citrus reticulata* peel oil inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation in culture and implanted in nude mice.** Castro MA, Rodenak-Kladniew B, Massone A, Polo M, García de Bravo M, Crespo R. *Food & Function*, 9 (2018): 2290-2299, 2018. DOI: 10.1039/C7FO01912B

### Presentaciones en Reuniones Científicas

- **Composición química y propiedades antiproliferativas del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata*) y salvia morada (*Lippia alba*).** Castro MA; Montero Villegas S; Cicció Alberti JF; Mijailovsky SJ; Rodenak Kladniew B; Galle M; Polo MP; García de Bravo M; Crespo R.

Jornadas de Medicina 2014. Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina. 23 y 24 de Octubre de 2014.

- **Role of limonene in cell proliferation, lipid synthesis and oxidative stress.** Castro MA; Galle M; Crespo R; García de Bravo M.

L Reunión Anual de SAIB. Rosario, Santa Fe, Argentina. 11 al 14 de Noviembre de 2014.

- **Evaluation of the antioxidant effects and potential antiatherogenic properties of monoterpenes.** Castro MA; Galle M; Montero Villegas S; García de Bravo M; Polo MP.

LI Reunión Anual de SAIB. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 3 al 6 de Noviembre de 2015.

- **Los lípidos del aceite de cáscara de mandarina inhiben la proliferación de células A549 in vitro e in vivo.** Castro MA; Peterson G; Massone A; Rodenak Kladniew BE; Montero Villegas S; Polo MP, García de Bravo MM; Crespo R.

Primeras Jornadas Conjuntas de Educación Médica, Extensión e Investigación 2016. Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina. 27 y 28 de Octubre de 2016.

- **In vitro and in vivo evaluation of mandarin peel oil on lipid metabolism and tumor growth.**

Castro MA; Peterson G; Polo M; García de Bravo M; Crespo R.

LI Reunión Anual de SAIB. Córdoba, Córdoba, Argentina. 7 al 10 de Noviembre de 2016.

- **Efecto del aceite de la cáscara de mandarina sobre la proliferación de células mononucleares RAW 264.7 y su diferenciación a células espumosas.** Castro MA; Peterson G; Rodenak Kladniew B; Polo MP; García de Bravo M; Crespo R; García de Bravo MM.

Segundas Jornadas Conjuntas de Educación Médica, Extensión e Investigación. Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina. 7 y 8 de Septiembre de 2017.

- **Oxidative and genotoxic effects of monoterpenes in human non-small cell lung cancer A549 cells.** Castro MA; Lavarías S; Soberón V; Rodenak Kladniew B; García de Bravo M; Crespo R.

Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 13 al 17 de Noviembre de 2017.

- **Evidencias bioquímicas, moleculares y biocomputacionales del efecto de compuestos naturales sobre un novedoso blanco terapéutico para aterosclerosis.** Castro MA; Llanos M; Gavernet L; García de Bravo M; Crespo R.

Jornadas de Investigación 2018. Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). La Plata, Buenos Aires, Argentina. 21 y 22 de Noviembre de 2018.

# Índice

Abreviaturas .....	v
Resumen.....	ix
Capítulo I. Introducción	
I.1. Relevancia del tema .....	1
I.2. Metabolismo lipídico .....	4
I.2.1. Colesterol .....	4
I.2.1.1. Homeostasis del colesterol.....	4
I.2.1.2. Vía del mevalonato.....	8
I.2.2. Triacilglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos.....	12
I.2.3. Receptores nucleares, reguladores del metabolismo lipídico .....	13
I.2.4. Metabolismo lipídico en hepatocitos y macrófagos: rol en aterosclerosis .....	14
I.2.5. Metabolismo lipídico y su rol en procesos tumorigénicos .....	17
I.3. Estrés oxidativo .....	19
I.4. Ciclo celular y apoptosis .....	22
I.5. Aceites de frutos cítricos y plantas aromáticas .....	26
I.5.1. Aceites esenciales .....	26
I.5.2. Carotenoides .....	27
I.5.3. Relevancia terapéutica de aceites esenciales y carotenoides .....	28
I.5.4. Aceite de la cáscara de <i>Citrus reticulata</i> .....	29
Capítulo II. Hipótesis y Objetivos	
II.1. Hipótesis .....	32
II.2. Objetivos Generales .....	32
II.3. Objetivos Específicos .....	32
Capítulo III. Materiales y Métodos	
III.1. Reactivos.....	34
III.2. Obtención del aceite de cáscara de mandarina (ACM).....	34
III.3. Caracterización del ACM .....	35
III.3.1. Análisis de componentes lipídicos no volátiles del ACM .....	35

III.3.2. Análisis de componentes lipídicos volátiles del ACM .....	37
III.4. Ensayos <i>in vitro</i> .....	38
III.4.1. Líneas celulares utilizadas, condiciones de cultivo celular y tratamiento .....	38
III.4.1.1. Línea Celular A549 .....	38
III.4.1.2. Línea Celular HepG2 .....	39
III.4.1.3. Línea Celular RAW 264.7 .....	40
III.4.2. Recuento Celular .....	44
III.4.3. Ensayo de MTT .....	44
III.4.4. Ensayo de Rojo Neutro .....	45
III.4.5. Citometría de flujo .....	46
III.4.6. Técnicas de cuantificación de proteínas .....	47
III.4.7. Medición de peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS .....	48
III.4.8. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes .....	49
III.5. Análisis de lípidos .....	50
III.5.1. Ensayos de incorporación de <sup>14</sup> C-Acetato en cultivos celulares .....	50
III.5.1.1. Obtención y separación de lípidos insaponificables, saponificables y ácidos grasos .....	51
III.5.1.2. Revelado de marca radiactiva .....	53
III.6. Ensayos en macrófagos .....	54
III.6.1. Obtención y oxidación de LDL .....	54
III.6.2. Diferenciación de macrófagos RAW 264.7 a células espumosas con LDL oxidadas .....	54
III.6.3. Cuantificación del contenido de gotas lipídicas .....	54
III.6.4. Cuantificación de ARNm mediante Real Time RT-PCR .....	55
III.7. Ensayos <i>in vivo</i> .....	59
III.7.1. Condiciones de mantenimiento de los animales .....	59
III.7.2. Desarrollo y mantenimiento de tumores provenientes de la línea A549 en ratones nude .....	60
III.7.3. Preparación del alimento suplementado con ACM .....	61
III.7.4. Evaluación de parámetros morfométricos .....	62
III.7.5. Estudios histopatológicos .....	63
III.7.6. Evaluación de parámetros bioquímicos séricos .....	63



III.7.7. Medición de peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS .....	66
III.7.8. Estudios de inmunohistoquímica: PCNA.....	67
III.8. Técnicas realizadas en ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	68
III.8.1. Ensayo de Western blot .....	68
III.8.1.1. Procesamiento de muestras .....	68
III.8.1.2. Electroforesis y transferencia .....	70
III.8.1.3. Inmunomarcación y revelado .....	71
III.8.2. Evaluación de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL .....	72
III.8.2.1. Procesamiento de muestras .....	72
III.8.2.2. Ensayo de TUNEL.....	73
III.9. Análisis estadístico .....	73
III.10. Bioética .....	74
Capítulo IV. Caracterización del aceite de cáscara de mandarina	
IV.1. Componentes lipídicos no volátiles .....	75
IV.2. Componentes lipídicos volátiles .....	79
IV.3. Discusión.....	80
Capítulo V. Efecto del aceite de cáscara de mandarina sobre el metabolismo lipídico	
V.1. Incorporación de <sup>14</sup> C-Acetato en lípidos de células hepáticas HepG2 tratadas con ACM ....	83
V.2. Efecto del ACM sobre el depósito lipídico en la línea celular de macrófagos Raw 264.7 .....	91
V.3. Efecto del ACM sobre la expresión génica de CD36, GPAT y CPT1 en células espumosas.....	95
V.4. Discusión.....	99
Capítulo VI. Efecto del aceite de cáscara de mandarina sobre la proliferación celular	
VI.1. Ensayos en líneas celulares tumorales en cultivo.....	105
VI.1.1. Efecto del ACM sobre la viabilidad y proliferación celular .....	105
VI.1.2. Efecto del ACM sobre la progresión del ciclo celular .....	107
VI.1.3. Efecto del ACM sobre la muerte celular programada o apoptosis .....	109
VI.2. Ensayos en ratones nude con desarrollo de tumores provenientes de células A549 .....	110
VI.2.1. Efecto del ACM sobre el crecimiento tumoral.....	111
VI.2.2. Efecto del ACM sobre la apoptosis y la proliferación celular en tejido tumoral .....	112
VI.2.3. Efecto del ACM sobre los niveles de proteína Ras .....	115

VI.2.4. Evaluación de toxicidad .....	116
VI.3. Discusión.....	119
Capítulo VII. Efecto antioxidante del aceite de cáscara de mandarina	
VII.1. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica de LDL.....	123
VII.2. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica de células A549 incubadas con CuSO <sub>4</sub> .....	124
VII.3. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica y la actividad de enzimas del sistema antioxidante en células A549 .....	125
VII.4. Discusión.....	130
Capítulo VIII. Conclusiones	
VIII.1. Conclusiones .....	133
Capítulo IX. Referencias	
IX.1. Referencias .....	136

## Abreviaturas

<b>ABC</b>	dependientes de ATP (del inglés <i>ATP binding cassette</i> )
<b>ACC</b>	acetil-CoA carboxilasa
<b>ACM</b>	aceite de cáscara de mandarina
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AE</b>	aceites esenciales
<b>AG</b>	ácidos grasos
<b>ALT</b>	alanina aminotransferasa
<b>APC/C</b>	complejo promotor de la anafase
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ASB</b>	albúmina sérica bovina
<b>AST</b>	aspartato aminotransferasa
<b>CAT</b>	catalasa
<b>CD36</b>	receptor scavenger tipo B (del inglés <i>cluster of differentiation 36</i> )
<b>CDK</b>	quinasa dependiente de ciclina (del inglés <i>cyclin dependent kinase</i> )
<b>CDNB</b>	1 cloro-2,4 dinitrobenceno
<b>CGC</b>	cromatografía gaseosa capilar
<b>CGC-MS</b>	cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas
<b>CKI</b>	proteínas inhibidoras de Cdk
<b>CL</b>	colesterol libre
<b>COV</b>	compuestos orgánicos volátiles
<b>CPT1</b>	carnitina aciltransferasa 1
<b>DAB</b>	diaminobencidina
<b>DAG</b>	diacilglicéridos
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>EC</b>	ésteres de colesterol

**ECV** enfermedades cardiovasculares

**EDTA** ácido etilen-diamin-tetra-acético

**EMAG** ésteres metílicos de ácidos grasos

**ERN** especies reactivas del nitrógeno

**FAS** ácido graso sintasa (del inglés *fatty acid synthase*)

**FC** fosfatidilcolina

**FE** fosfatidiletanolamina

**FID** detector de ionización de llama (del inglés *flame ionization detector*)

**FL** fosfolípidos

**FPP** farnesil pirofosfato

**FS** fosfatidilserina

**FTasa** farnesiltransferasa

**FXR** receptor X farnesoide (del inglés *farnesoid X receptor*)

**GC** cromatógrafo gaseoso

**GC-MS** cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas

**GGTasa** geranilgeraniltransferasa

**GGPP** geranilgeranil pirofosfato

**GPAT** glicerol-3-fosfato aciltransferasa

**GSH** glutatión reducido

**GST** glutatión-S-transferasa

**HDL** lipoproteínas de alta densidad (del inglés *high density lipoprotein*)

**HMG-CoA** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

**HMGCR** HMG-CoA reductasa

**HS-SPME** microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (del inglés *headspace solid-phase microextraction*)

**IC50** concentración que inhibe el 50% de la proliferación celular

**IC50sc** concentración que inhibe el 50% la síntesis de colesterol

**IM** inmunohistoquímica

**IP** ioduro de propidio

**IPP** isopentenil pirofosfato

**LDL** lipoproteínas de baja densidad (del inglés *low density lipoprotein*)

**LDLox** lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**LDLR** receptor de LDL

**Li** limoneno

**LPL** lipoprotein lipasa

**LXR** receptor X hepático (del inglés *liver X receptor*)

**LXRE** elementos de respuesta de LXR

**MDA** malondialdehído

**MEM** medio esencial mínimo de Eagle

**MOS** 2,3-oxidoescualeno

**MP** membrana plasmática

**MTT** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil- tetrazolio

**NOS** óxido nítrico sintasa

**NOX** NADPH-oxidasa

**OSC** 2,3-oxidoescualeno: lanosterol ciclasa

**PBS** buffer fosfato salino (del inglés *phosphate-buffered saline*)

**PCNA** antígeno nuclear de proliferación celular (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*)

**PCR** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

**PPAR** receptor activado por el factor proliferador de peroxisoma (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor*)

**PVDF** polifluoruro de vinilideno

**qPCR** PCR cuantitativa en tiempo real

**RE** retículo endoplásmico

**RN** rojo neutro

**ROS** especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

**RXR** receptor del ácido 9 cis-retinoico (del inglés *retinoid X receptor*)

**SDS** dodecil sulfato de sodio

**SFB** suero fetal bovino

**SM** escualeno monoxigenasa

**SOD** superóxido dismutasa

**TAG** triacilglicéridos

**TBA** ácido tiobarbitúrico

**TBARS** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**TLC** cromatografía en capa fina (del inglés *thin layer chromatography*)

**TLR** receptor tipo Toll (del inglés *toll like receptor*)

**TUNEL** marcado de final de corte de desoxinucleótidos tri-fosfato por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés *TdT-mediated dUTP nick end labelling*)

**VLDL** lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés *very low density lipoprotein*)

**VM** vía del mevalonato

## Resumen

En nuestro laboratorio se demostró en líneas celulares tumorales, que monoterpenos como geraniol, cineole, limoneno y linalool poseen propiedades hipocolesterogénicas y antiproliferativas y que éstas a su vez son potenciadas de manera sinérgica al combinar los compuestos individuales (Kladniew et al. 2014; Manassero et al. 2013; M P Polo, Crespo, and De Bravo 2011). Por otro lado, existen numerosos reportes bibliográficos acerca del efecto antioxidante que poseen distintos aceites esenciales y/o sus componentes individuales. A partir de estos resultados se planteó que el aceite de la cáscara de mandarina (ACM) *Citrus reticulata* Blanco variedad Dancy, que posee una mezcla de varios isoprenoides, presenta un gran potencial en el tratamiento de hipercolesterolemias, prevención de aterosclerosis y enfermedades tumorales.

Para ello nos propusimos estudiar la capacidad de este aceite de modular vías metabólicas lipídicas asociadas al desarrollo de estas patologías. Se evaluaron los mecanismos bioquímicos y moleculares que desencadena el ACM a fin de aportar conocimiento sobre su potencial utilidad terapéutica en reemplazo o complemento de terapias existentes en el tratamiento de hipercolesterolemias, prevención de enfermedades cardiovasculares y como quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos.

Se determinó la composición lipídica del ACM empleando técnicas cromatográficas y espectrofotométricas. Se evaluó el potencial antiaterogénico estudiando los efectos y mecanismos del aceite sobre la síntesis de lípidos, en particular sobre la vía del mevalonato (VM) empleando precursores radiactivos en un modelo de célula hepática humana (HepG2). Se estudiaron los efectos del aceite sobre el depósito de lípidos de reserva citoplasmática en células espumosas obtenidas por diferenciación de macrófagos (RAW 264.7) incubados con lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas; así como el efecto en los niveles de expresión de enzimas responsables de la síntesis y degradación de los mismos. Además se analizó el efecto antioxidante del aceite sobre las LDL involucradas en el proceso de formación de placas ateroscleróticas.

Para evaluar el potencial antitumoral del ACM se estudiaron los efectos y mecanismos de acción del aceite sobre la viabilidad, proliferación y muerte celular en un modelo de célula

tumoral humana (A549) realizando ensayos bioquímicos-moleculares en células en cultivo (ensayos *in vitro*) e implantadas en ratones atímicos (ensayos *in vivo*). Se analizó además el efecto del aceite sobre el estado redox celular evaluando los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de enzimas del sistema antioxidante en células A549.

El ACM contiene compuestos volátiles y no volátiles. Más del 90% de la fracción volátil corresponde al limoneno (Li) y el resto a distintos compuestos isoprenoides. En la fracción no volátil se encuentran: triacilglicéridos y carotenoides (libres y esterificados).

Los efectos de bajas concentraciones del aceite que no disminuyen la viabilidad celular (<60  $\mu\text{L/L}$ ) sobre el metabolismo lipídico en hepatocitos mostraron una inhibición de la síntesis de colesterol con un aumento la incorporación de acetato en los intermediarios de la VM, escualeno y lanosterol. En cambio altas concentraciones del ACM ( $\geq 60 \mu\text{L/L}$ ), disminuyen en hepatocitos no sólo la síntesis de colesterol, sino también la incorporación de acetato en todos los intermediarios de la VM evaluados. En células espumosas se observó una disminución del contenido de lípidos neutros. La disminución de los niveles de expresión de GPAT3 observada estaría contribuyendo a la reducción del contenido lipídico en estas células.

El ACM posee mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales estudiadas (en un rango de 113-176  $\mu\text{L/L}$ ), que su componente mayoritario el Li (en un rango de 157-195  $\mu\text{L/L}$ ), lo que sugiere que la combinación de los distintos compuestos presentes en el ACM, generaría un efecto sinérgico o aditivo sobre la inhibición de la viabilidad celular de HepG2 y A549.

El aceite bloquea la progresión del ciclo celular de las células A549 (línea tumorigénica). Las concentraciones evaluadas del ACM causaron un aumento en la población de células en fase G2/M con una simultánea disminución de células en fase S y las células tratadas con las concentraciones más altas del ACM (IC50) mostraron cambios significativos en todas las etapas del ciclo, promoviendo un arresto más pronunciado en la fase G0/G1 con disminución de los niveles de ciclina E, aumento de los de ciclina B1 en ambas concentraciones estudiadas y sin diferencias significativas en la expresión de ciclina D1. Además, la cuantificación de las imágenes obtenidas en células A549 por microscopía de fluorescencia demostró que tanto bajas (IC25) como altas concentraciones (IC50) del ACM



ocasionaron un incremento significativo del porcentaje de células TUNEL positivo, evidenciando un efecto pro-apoptótico del aceite.

Los ensayos *in vivo* demostraron una reducción significativa en el crecimiento tumoral cuando se le administró a los animales una dosis de 5.25 mg ACM/ratón/día en el alimento. El ACM incrementó la apoptosis en células tumorales *in vivo* (0.5-1.7%). No se observaron cambios significativos en la ingesta de alimento, peso corporal, peso e histología de órganos ni en parámetros bioquímicos séricos de toxicidad hepática en ratones tratados con el ACM.

El análisis por Western blot mostró que los niveles de Ras unida a membrana disminuyeron significativamente en los tumores de ratones tratados con 5.25 mg ACM/ratón/día, con respecto a los tumores control. Esta proteína anclada a la membrana desempeña un papel central en la promoción de la proliferación celular. Sin embargo, los niveles totales de Ras no variaron significativamente en ninguno de los grupos experimentales. Se observó una tendencia al aumento en los niveles de peroxidación lipídica en tumor, así como una disminución de los mismos en hígado.

Por último el ACM disminuyó los niveles de peroxidación lipídica en LDL humanas y en células en cultivo incubadas con un agente inductor de estrés oxidativo e incrementó en las células en cultivo, en un estado redox fisiológico, la actividad de enzimas fundamentales del sistema antioxidante celular como son catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión-S-transferasa (GST).

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran que el ACM, a través de múltiples mecanismos, ejerce un efecto antiproliferativo y antilipogénico que permite sugerir su utilidad terapéutica en reemplazo o complemento de terapias existentes en el tratamiento de hipercolesterolemias, prevención de enfermedades cardiovasculares y como quimiopreventivo y/o quimioterapéutico.

# Capítulo I

## Introducción

### I.1. Relevancia del tema

Los cambios en el estilo de vida como el aumento de la urbanización, del tabaquismo, de las dietas ricas en grasas y la inactividad física, conjuntamente con el envejecimiento de la población, han contribuido a que en los países latinoamericanos se dé una transición epidemiológica, donde la causalidad de la morbilidad y mortalidad pasa de enfermedades comunes transmisibles a enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer, diabetes mellitus y enfermedades respiratorias crónicas (Rivera-Andrade and Luna 2014; Lanas et al. 2007).

Las ECV son un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al sistema circulatorio dentro de las que se incluyen: las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares (comúnmente conocidos como ACV), arteriopatías periféricas, cardiopatías reumáticas y congénitas, así como los eventos trombóticos (Organización Panamericana de la Salud 2016).

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. (Abeyá Gilardon 2005; Dirección de Estadísticas e Información de Salud 2016) (Figura I.1).

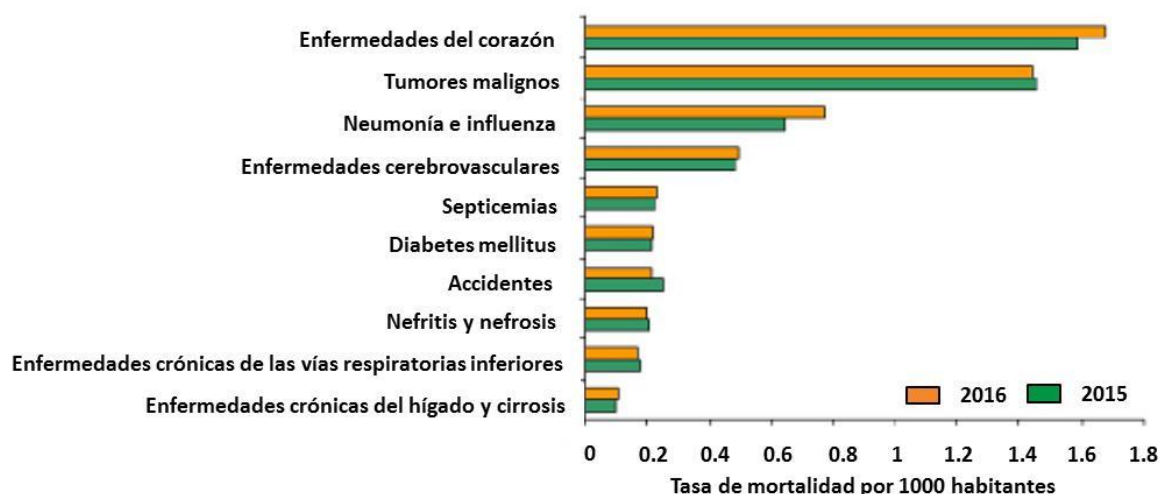


Figura I.1. Tasa de mortalidad para las principales causas de muerte en la República Argentina de 2015 a 2016. Estas cifras fueron obtenidas a partir de datos oficiales publicados por la Dirección de Estadísticas e Información de Salud del Ministerio de Salud de la Nación.

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 (Unit 2005; Cuello et al. 2013; Taylor et al. 2011).

Los factores de riesgo cardiovascular son características biológicas o hábitos de vida que aumentan la probabilidad de padecer una ECV en aquellos individuos que los presentan (L. B. Goldstein et al. 2006). Dentro de los factores de riesgo se encuentran los no modificables como edad, sexo y antecedentes hereditarios, y los modificables como el sobrepeso/obesidad, tabaquismo, sedentarismo, dieta aterogénica, etc. Las dislipidemias, niveles anormales de lipoproteínas en plasma, son uno de los factores de riesgo cardiovascular modificables más relevantes sobre la incidencia de las ECV, ya que juegan un rol predominante en la iniciación y desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Wadhera et al. 2016).

La utilidad de las estatinas como drogas hipocolesterolemiantes está ampliamente comprobada (Unit 2005; Trialists 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 and Kosenko 2010; Taylor et al. 2011). Las estatinas inhiben competitivamente la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), enzima limitante 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 con estatinas. Esto implica un gran 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 opción atractiva tanto desde el punto de vista terapéutico (disminución de efectos secundarios) como del económico.

A consecuencia de esto, la obtención de medicamentos de origen natural que apoyen el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles como las dislipidemias, constituye una de las líneas de investigación de primer orden a nivel mundial. Actualmente, ya sea por el alto costo de los tratamientos convencionales o por los efectos secundarios de las actuales drogas hipolipemiantes, se ha incrementado la utilización de plantas medicinales y sus

complementos en el tratamiento de dislipidemias, inclusive en países desarrollados (Bahmani et al. 2015; Tabatabaei-Malazy, Larijani, and Abdollahi 2015).

Por otro lado, los decesos ocasionados por tumores malignos representan la segunda causa de muerte en Argentina (Dirección de Estadísticas e Información de Salud 2016). Cada vez es más frecuente que se asocie la presencia de dislipidemias, ya sea como factor de riesgo aislado o como parte del síndrome metabólico, con la aparición de cáncer (Braun, Bitton-Worms, and LeRoith 2011; Sinagra et al. 2002; Agnoli et al. 2014; Gutierrez-Pajares et al. 2016; Zadra, Photopoulos, and Loda 2013).

Las células tumorales presentan un elevado metabolismo lipídico, reflejado tanto en la incorporación de lípidos del torrente sanguíneo como en la maquinaria de síntesis endógena (Muñoz-Pinedo, El Mjiyad, and Ricci 2013; Baenke et al. 2013; F. Zhang and Du 2012). Muchos de los tumores presentan alteraciones en las vías de señalización celular como la PI3K/AKT y MAPK, así como la activación de oncogenes como p53. Estas alteraciones generan la desregulación de la expresión y/o actividad de múltiples enzimas pertenecientes a vías metabólicas lipídicas (Mullen et al. 2016; Santos and Schulze 2012).

Por otra parte, la VM es uno de los principales procesos de síntesis que se encuentra desregulado en la mayoría de las células tumorales e inclusive se ha sugerido como una vía oncogénica (Mullen et al. 2016). El colesterol, producto final mayoritario de esta vía, es un componente crucial de la biogénesis de membranas y es requerido para la proliferación celular. Existen múltiples estudios donde se postula que la proliferación de células tumorales es altamente dependiente de la biosíntesis de colesterol y sus derivados, y que la desregulación de esta vía registrada en células neoplásicas puede llevar a la promoción y resistencia de los tumores (Kuzu, Noory, and Robertson 2016). Además, esta vía es la generadora de isoprenoides que son necesarios para la prenilación de proteínas que regulan el crecimiento y/o transformación celular; de modo que, la inhibición de la prenilación de estas proteínas se traduce en una disminución del crecimiento y proliferación celular (Jiang et al. 2014; Thurnher, Gruenbacher, and Nussbaumer 2013; Swanson and Hohl 2006).

En diversos estudios preclínicos y clínicos se ha demostrado que fármacos que inhiben la VM presentan un potencial efecto preventivo de tumores (Künzl, Wasinger, and Hohenegger 2013; Kubatka et al. 2014; ALTwaIRGI 2015) y estudios prospectivos de su utilización en pacientes con

cáncer evidencian una disminución de la mortalidad así como la presencia de tumores más diferenciados (ALTwAIRGI 2015; Cruz et al. 2013; Strykowska-Góra et al. 2015). De modo que, esta clase de fármacos se consideran promisorios en el tratamiento de tumores (Likus et al. 2016; Thurnher, Nussbaumer, and Gruenbacher 2012), en especial en combinación con otros quimioterapéuticos (ALTwAIRGI 2015; Sylvester 2012; McAnally et al. 2007; Staedler et al. 2012; Osmak 2012). Sin embargo, una de las principales encrucijadas en el uso de estos fármacos es que se requieren concentraciones elevadas para alcanzar el efecto antitumoral con el consiguiente incremento del riesgo de presentar efectos secundarios adversos.

Una alternativa viable en la investigación de nuevas terapias para el cáncer es el estudio de aceites esenciales de plantas aromáticas, dado que los isoprenoides naturales que los constituyen son capaces de modular la VM ejerciendo un efecto antitumoral (Hardcastle et al. 1999; Crowell et al. 1991; Ren, Elson, and Gould 1997; Afshordel et al. 2015).

Por estas razones, el estudio de aceites esenciales como agentes con potenciales propiedades hipolipemiantes y antiproliferativas se ha convertido en un campo en creciente estudio, de gran interés y potencial.

### **I.2. Metabolismo lipídico**

#### **I.2.1. Colesterol**

##### **I.2.1.1. Homeostasis del colesterol**

El colesterol es una molécula lipídica esencial de los organismos del reino animal para la estructura y el funcionamiento de las membranas celulares, particularmente en la membrana plasmática (MP) (Chang et al. 2006).

Este lípido de membrana es necesario para la formación de caveolas y balsas lipídicas cumpliendo un rol importante en el tráfico vesicular, en procesos de señalización transmembrana y en la viabilidad y proliferación celular (Goedeke and Fernández-Hernando 2012; van der Wulp, Verkade, and Groen 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 and Fernández-Hernando 2012).

Sin embargo, el exceso de colesterol se ha relacionado con diversas enfermedades: se lo identificó por primera vez en 1769 como el componente principal de los cálculos biliares

humanos. Desde entonces se ha observado que su concentración fuera de los parámetros aceptables se asocia a una variedad de enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer y diversas malformaciones (Cortes et al. 2013). La estructura del colesterol representada en la Figura I.2 consiste en cuatro anillos (A, B, C, D), con dos grupos metilo angulares situados en C10 y C13; éstas son características que comparten todos los esteroides naturales. El colesterol también contiene un grupo  $3\beta$ -OH en el anillo A, que lo convierte en una molécula anfipática, un doble enlace entre el C5 y C6 y una cadena lateral (isooctilo) en el C17.

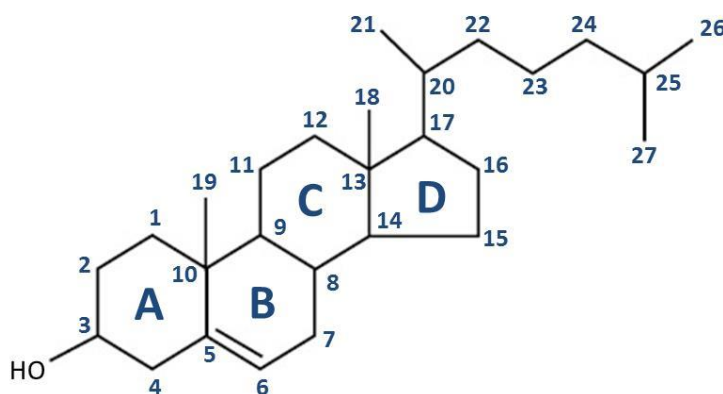


Figura I.2. Estructura de la molécula del Colesterol. La estructura de colesterol consiste en cuatro anillos (A, B, C, D), con dos grupos metilo angulares situados en C10 y C13, contiene un grupo  $3\beta$ -OH en el anillo A, un doble enlace entre C5 y C6 y una cadena lateral (isooctilo) en C17.

El colesterol del que dispone el organismo tiene dos orígenes: endógeno, procedente de la síntesis *de novo*, y exógeno, procedente de la dieta (Chang et al. 2006). El último se transporta inicialmente desde el intestino al hígado desde donde se distribuye a todos los tejidos. Para el transporte a través del medio acuoso (linfa y sangre), enterocitos y hepatocitos empaquetan colesterol y ésteres de colesterol (EC) en lipoproteínas de varios tamaños y composiciones que se modifican en la circulación.

El colesterol dietético se absorbe por los enterocitos del intestino delgado y junto con los triacilglicéridos (TAG) es transportado por las lipoproteínas de mayor tamaño denominadas quilomicrones. Algunos de los TAG se hidrolizan en la circulación dando lugar a los remanentes de quilomicrones que son captados por los hepatocitos (Chang et al. 2006). El hígado juega un rol central en el metabolismo del colesterol sintetizando lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Kwiterovich Jr 2000). Si bien la principal función de las partículas VLDL parece ser el

## Introducción

transporte de TAG desde el hígado a los órganos periféricos para oxidación o almacenamiento, estas partículas también contienen colesterol libre (CL) y EC. Durante el metabolismo de las partículas de VLDL, con la remoción de una extensa porción de TAG en los tejidos periféricos, se forman partículas remanentes que pueden ser convertidas en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kwiterovich Jr 2000). Las células de mamíferos adquieren el colesterol exógeno principalmente de LDL, a través de la vía del receptor de LDL (LDLR) (Chang et al. 2006) (Figura I.3) . Las LDL circulantes se unen al LDLR en la superficie celular y se incorporan, como un complejo de lipoproteína-receptor a través de vesículas revestidas de clatrina, en compartimentos endolisosomales para su posterior procesamiento. En este nivel, el LDLR se recicla a la superficie celular por la unión con la proteína convertasa de proteínas subtilisina/kexina 9 (PCSK9) (Lambert et al. 2012), mientras que las partículas de LDL son totalmente degradadas en sus componentes individuales.

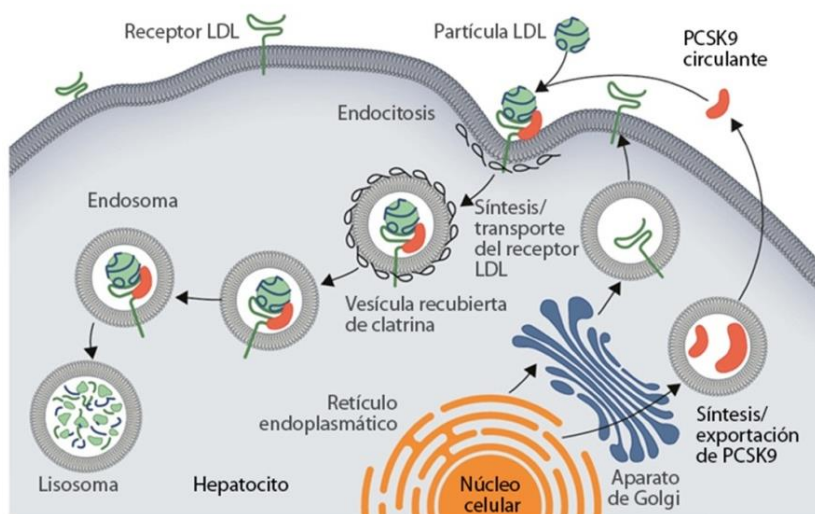


Figura I.3 Internalización y reciclado del receptor de LDL (LDLR) a través de la membrana plasmática (MP) donde la proteína convertasa de proteínas subtilisina/kexina 9 (PCSK9) promueve la degradación del receptor y el reciclado a la membrana. Tomado de (Lambert et al. 2012).

Los EC derivados de las LDL se hidrolizan para formar CL y ácidos grasos (AG) por la acción de la lipasa ácida lisosomal (Cortes et al. 2013). Cuando los tejidos extrahepáticos tienen exceso de colesterol, éste se libera a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), sintetizadas también a nivel hepático. Las HDL devuelven los lípidos al hígado en un proceso llamado transporte reverso del



## Introducción

colesterol (Ohashi et al. 2005). Desde el hígado, el colesterol se excreta en la bilis (ya sea como colesterol o después de que se ha metabolizado a ácidos biliares) que entra en el intestino delgado. A partir de ahí, el colesterol y las sales biliares se reabsorben (ciclo enterohepático) o bien son excretados en las heces (van der Wulp, Verkade, and Groen 2013) (Figura I.4).

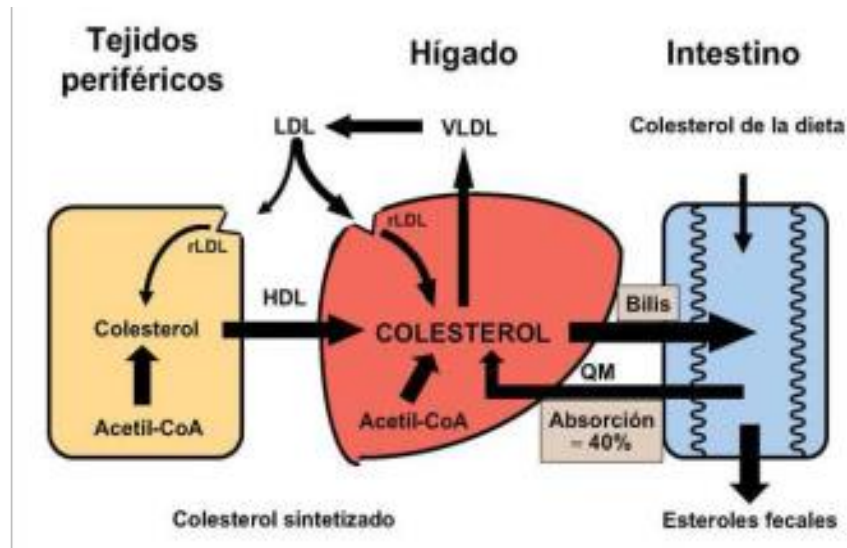


Figura I.4. Homeostasis general del colesterol en el organismo. Abreviaturas. HDL: lipoproteínas de alta densidad; rLDL: receptor para las lipoproteínas de baja densidad (LDL); QM: quilomicrones; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. Figura adaptada de (Ros 2006).

La proporción de colesterol procedente de la síntesis endógena suele ser mayor que la absorbida de la dieta, y el conjunto de los dos supera a la cantidad de colesterol consumida por el organismo, lo que obliga a metabolizar o excretar, o ambas cosas, el exceso de colesterol para lograr mantener un equilibrio. Los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo de la molécula del colesterol, por lo que sólo pueden modificar ligeramente su estructura. Debido a ello, el colesterol es excretado del organismo en forma inalterada o tras su transformación en otros productos derivados tales como los ácidos biliares o las hormonas esteroideas (Tall 2008; van der Veen et al. 2009). La cantidad de colesterol de la dieta varía notablemente de un día a otro, lo que obliga a la existencia de mecanismos de control que permitan mantener el equilibrio entre las velocidades de síntesis y excreción en relación con el que es absorbido. Tales mecanismos de control suelen funcionar correctamente, y garantizar la disponibilidad de las cantidades adecuadas de colesterol para satisfacer las necesidades de los distintos tejidos. En situaciones patológicas tiene lugar un desequilibrio de dichos procesos, lo

que lleva a un incremento de los niveles circulantes de colesterol o a un exceso del mismo que es eliminado por vía biliar. En el primer caso, los EC pueden llegar a acumularse en las células de la pared arterial y originar el desarrollo de la arteriosclerosis (Kwiterovich Jr 2000; van der Wulp, Verkade, and Groen 2013). En el segundo, la bilis puede llegar a sobresaturarse de colesterol, que al final precipita, dando lugar a cálculos biliares (Portincasa, Moschetta, and Palasciano 2006; D. Q. H. Wang, Cohen, and Carey 2009).

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

### **I.2.1.2. Vía del mevalonato**

La VM (Figura I.5) es una ruta metabólica de gran importancia que provee a la célula de moléculas bioactivas vitales para múltiples procesos celulares (Buhaescu and Izzedine 2007). Esta vía sintetiza mevalonato a partir de acetato, para luego convertirlo en productos isoprenoides esteroideos como el colesterol (componente esencial de la MP, precursor de ácidos biliares y hormonas) y en un amplio número de moléculas hidrofóbicas, isoprenoides no esteroles, como el dolicol (participa en la glicosilación de proteínas), ubiquinona (constituyente de la cadena transportadora de electrones mitocondrial) y grupos isopreno. Estos últimos compuestos intermediarios de la ruta biosintética del mevalonato, juegan un papel importante en la modificación post-traducciona l de una gran cantidad de proteínas implicadas en la señalización intracelular y son esenciales en el crecimiento/diferenciación celular, la glicosilación de proteínas y el ensamblaje del citoesqueleto (Buhaescu and Izzedine 2007; Zhou and Liao 2009; Miziorko 2011).

## Introducción

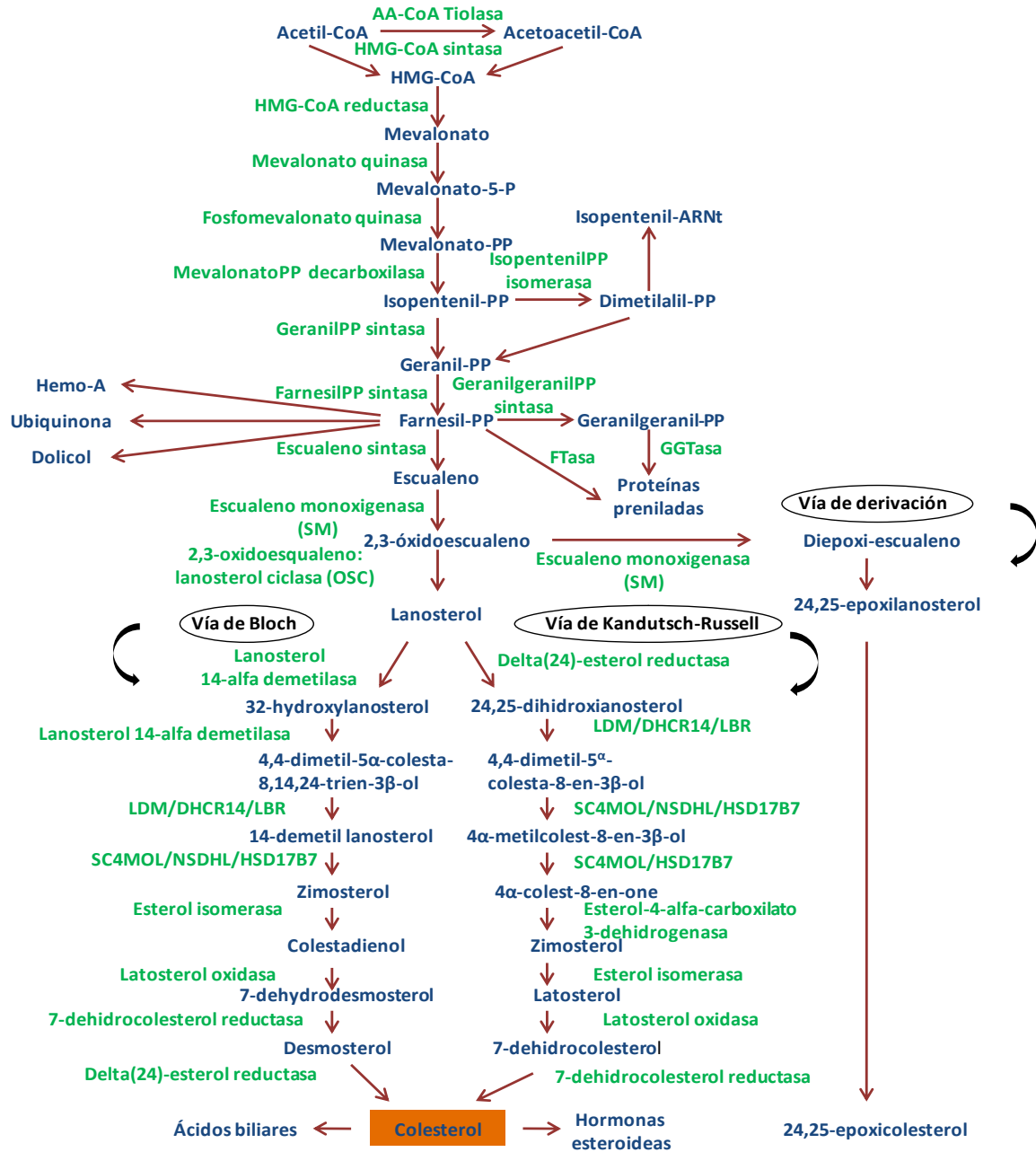


Figura I.5. Vía del Mevalonato. Se representan los intermediarios y productos finales de la vía en color azul y las enzimas que intervienen en color verde. Abreviaturas. DHCR14: delta(14)-esterol reductasa; FTasa: farnesiltransferasa; GGTasa: geranilgeraniltransferasa; HSD17B7: hidroxiesteroide (17-beta) dehidrogenasa 7; LBR: receptor lamina B; LDM: lanosterol 14-alfa demetilasa; NSDHL: esterol-4-alfa-carboxilato 3-dehidrogenasa; SC4MOL: metilesterol monooxygenase 1. Modificado de (Sharpe and Brown 2013).

La VM es una ruta multienzimática que se lleva a cabo en las fracciones microsomal y soluble

del citoplasma y fue originalmente descrita en hígado de mamíferos por Bloch en 1952 (Bloch 1965). Comienza con la síntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a partir de acetil-CoA en un par de reacciones que ocurren en el citoplasma catalizadas por las enzimas acetoacetil coenzima A tiolasa y HMG-CoA sintasa. Estas reacciones se continúan por una reacción que sintetiza mevalonato a partir de HMG-CoA catalizada por una proteína integral de retículo endoplásmico (RE): HMGCR, siendo ésta la enzima limitante de la vía (J. L. Goldstein and Brown 1990). Luego de una serie de reacciones se genera una molécula de cinco carbonos: isopentenil pirofosfato (IPP), unidad estructural cuya polimerización dará origen a los distintos productos poliisoprenoides de la vía. En este punto se produce la primera ramificación de la ruta, dado que el IPP es utilizado tanto para la generación de isopentenil ARNt como para la síntesis de la molécula de 15 carbonos farnesil pirofosfato (FPP) (Swanson and Hohl 2006; Buhaescu and Izzedine 2007) que constituye el mayor punto de ramificación en la biosíntesis de poliisoprenoides. Este compuesto es el sustrato de distintas reacciones enzimáticas que conducen la síntesis de diferentes productos:

1) Dos moléculas de FPP pueden unirse en una reacción cabeza-cabeza para formar escualeno, un compuesto de 30 carbonos. La enzima escualeno sintasa cataliza esta reacción, siendo éste el primer paso comprometido en la biosíntesis del colesterol. Luego, el escualeno es convertido a 2,3-oxidoescualeno (MOS) por acción de la enzima escualeno monoxigenasa (SM). Seguidamente el MOS es transformado en lanosterol por la enzima 2,3-oxidoescualeno: lanosterol ciclase (OSC), y éste a su vez se convierte en colesterol después de una serie de reacciones adicionales (Buhaescu and Izzedine 2007). El oxiesterol endógeno y emergente regulador de la colesterogénesis (24,25-epoxicolesterol) (Brown 2009; Bjorkhem and Diczfalusy 2004; Spencer et al. 1985) es sintetizado de forma paralela al colesterol en una reacción derivada (shunt) de la VM en la que participan la SM y la OSC.

2) El FPP puede unirse con grupos IPP o con cadenas cortas de poliprenoles por repetidas condensaciones cabeza-cola para formar largas cadenas de poliprenoles con todas sus dobles ligaduras en configuración trans. En humanos, cuando estas cadenas alcanzan las 10 unidades de isopreno, el grupo poliprenilo es transferido a un anillo aromático derivado de la tirosina, para iniciar la síntesis de ubiquinona (Dallner and Sindelar 2000; Bentinger, Tekle, and Dallner 2010).

## Introducción

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

4) Finalmente el FPP o su derivado geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (obtenido a partir de la condensación entre FPP e IPP por la geranilgeranil pirofosfato sintasa) pueden unirse covalentemente a distintas proteínas con múltiples funciones dentro de la célula (modificación postraducciona) (Berndt, Hamilton, and Sebt 2011; Thurnher, Nussbaumer, and Gruenbacher 2012; Thurnher, Gruenbacher, and Nussbaumer 2013). Farnesil transferasa (FTasa) y geranilgeranil transferasa (GGTasa) son dos enzimas que llevan a cabo la reacción de prenilación en la célula. FTasa cataliza la adición del FPP a la proteína, proceso denominado farnesilación, y las geranilgeranil transferasas GGTasa I y II catalizan la adición de uno o dos residuos de GGPP, proceso denominado geranilgeranilación. Las proteínas farnesiladas incluyen a: Ras, Rho B, HDJ2 y láminas A y B, y las proteínas geranilgeraniladas incluyen: Rab, Rap 1A, Rho A, Rac 1, CDC42 (Swanson and Hohl 2006). La prenilación ocurre en una secuencia C-terminal CAAX (donde C es cisteína, A es un aminoácido alifático y X puede ser cualquier aminoácido), donde el residuo C se conjuga con FPP o GGPP (Figura I.6). Esto se continúa por la eliminación proteolítica del tripéptido AAX a cargo de la endopeptidasa *RAS-converting enzyme1* y por carboximetilación en el residuo de cisteína isoprenilado por la isoprenilcisteína carboximetiltransferasa en el RE.

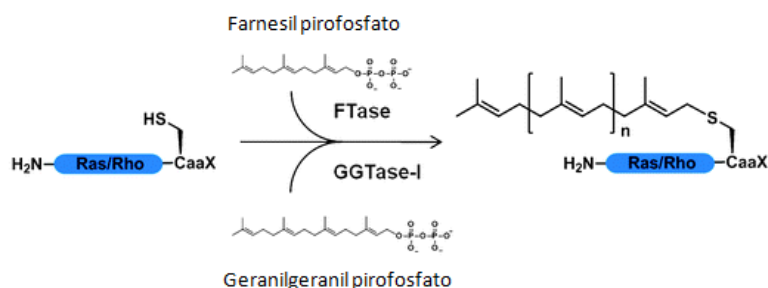


Figura I.6. Reacción catalizada por las preniltransferasas Farnesil transferasa (FTasa) y geranilgeranil transferasa (GGTasa)

La prenilación promueve la unión de estas proteínas a las membranas celulares. Esta modificación postraducciona y la activación de GTPasas como Rho, Rac, Rab, Rap y Ras juegan un importante papel en muchas cascadas de señalización dentro de la célula (Hinson et al. 1997;

Edwards and Ericsson 1999; Bonetti et al. 2003).

### **I.2.2. Triacilglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos**

Además del colesterol, otros lípidos desempeñan diversas funciones en el organismo actuando como fuente de energía, componentes de las membranas celulares y precursores de moléculas que están involucradas en múltiples procesos biológicos. Al igual que el colesterol estos lípidos pueden provenir de dos fuentes: la dieta y la síntesis endógena.

La síntesis de AG tiene lugar en prácticamente todas las células de animales vertebrados pero estas vías son particularmente importantes en el hígado y el tejido adiposo, órganos especializados en la exportación y almacenaje de lípidos (Eberle et al. 2004). La síntesis de AG se realiza a partir de unidades de dos carbonos en la forma de acetil-CoA siendo la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) la que cataliza la carboxilación del acetil-CoA para dar malonil-CoA, sustrato indispensable para este proceso. Posteriormente, la síntesis continúa con el complejo de la ácido graso sintasa (FAS) en una serie de reacciones que generan palmitato, un AG saturado de 16 carbonos. Por medio de desaturaciones y/o elongaciones, el palmitato es utilizado para generar un amplio espectro de AG saturados e insaturados que son sintetizados por la célula (Baenke et al. 2013). Recíprocamente, la vía de degradación de los AG ó  $\beta$ -oxidación implica un mecanismo de regulación a través de modulación alostérica por malonil-CoA de la carnitina aciltransferasa 1 (CPT1).

Los AG sintetizados por la célula y aquellos provenientes de la dieta, pueden ser utilizados para generar diferentes tipos de lípidos. Por medio de la vía del glicerol 3- fosfato (Kennedy 1961), pueden dar origen a diacilgliceridos (DAG) y TAG. Para ello, el glicerol 3-fosfato se esterifica secuencialmente con acilCoAs en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la molécula, dando como productos el ácido lisofosfatídico y el ácido fosfatídico. Estas reacciones de acilación están catalizadas por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y acilglicerolfosfato aciltransferasa respectivamente. Particularmente, se han descripto cuatro isoformas de GPAT en mamíferos (GPAT1-4). Estas isoenzimas se diferencian por su ubicación subcelular y tisular, su sensibilidad a sustancias reactivas a grupos -SH como la N-etilmaleimida y por su preferencia de sustrato (Wendel, Lewin, and Coleman 2009). La GPAT3 (que será estudiada en este trabajo) fue la primer GPAT microsomal en ser clonada (J. Cao et al. 2006), su expresión es alta en tejido

adiposo, en donde representa el 80% de la actividad GPAT (J. Cao et al. 2014). Además, se expresa altamente en intestino delgado y cumple un rol relevante en la absorción de lípidos provenientes de la dieta (Khatun et al. 2016). Por otro lado, también se ha descrito que GPAT3 se expresa en macrófagos y que su expresión aumenta luego de que los mismos son activados con LPS o con LDLox (Feingold et al. 2012; Quiroga 2017).

Finalmente, el grupo fosfato del ácido fosfatídico, se hidroliza en una reacción catalizada por la enzima fosfatidato fosfohidrolasa para dar 1,2-diacil-*sn*-glicerol, el cual se esterifica en la posición 3 dando TAG. Esta última reacción está catalizada por la enzima acilCoA: diacilglicerol aciltransferasa.

Alternativamente, tanto a partir del ácido fosfatídico como del DAG, pueden ser sintetizados distintos fosfolípidos (FL), componentes mayoritarios de las membranas biológicas, como son fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (FS).

### **I.2.3. Receptores nucleares, reguladores del metabolismo lipídico**

Los receptores nucleares son factores de transcripción activados por ligandos que modulan la expresión de varios genes del metabolismo lipídico ya que son activados en respuesta a modificaciones en los niveles celulares de productos finales y/o intermediarios de distintas vías lipogénicas, induciendo respuestas compensatorias que permiten el mantenimiento de la homeostasis lipídica. La expresión de los receptores nucleares es dependiente del tipo de tejido y contexto celular, y la desregulación de su expresión está involucrada en diversas enfermedades como cáncer, alteraciones cardiovasculares y diabetes (Ortega-Domínguez, Herrera-Ramírez, and Tecalco-Cruz 2015).

Algunos miembros de esta superfamilia son sensores de lípidos, como el receptor activado por el factor proliferador de peroxisoma (PPAR), el receptor X hepático (LXR) y el receptor X farnesoide (FXR) que pueden unir moléculas como AG, eicosanoides y oxiesteroles y traducir señales del entorno lipídico en cambios en la expresión génica (Goto et al. 2013; Desvergne, Michalik, and Wahli 2006).

Los LXR son uno de los principales receptores nucleares que regulan la homeostasis del colesterol y los AG. Se han identificado dos isoformas denominadas LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , que difieren

en el patrón de distribución tisular. La expresión de LXR $\alpha$  se limita al riñón, intestino, tejido graso, macrófagos, pulmón e hígado, donde la misma es la más elevada. En cambio, LXR $\beta$  se expresa en casi todos los tejidos y órganos. Sus ligandos endógenos son metabolitos del colesterol conocidos como oxистерoles, así como también intermediarios de la colesterogénesis como el demosterol. Tras su activación, forman heterodímeros con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (*Retinoid X Receptor*, RXR) y regulan la expresión de genes al unirse a regiones denominadas elementos de respuesta de LXR (LXRE) (Figura I.7).

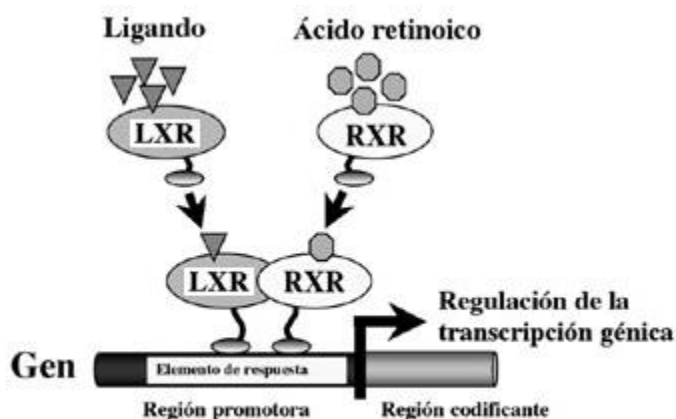


Figura I.7. Mecanismo de acción de los receptores nucleares heterodiméricos. Abreviaturas. LXR: receptor X hepático; RXR: receptor del ácido 9 cis-retinoico. Tomado de (Cortés et al. 2005).

Estos factores de transcripción participan en el proceso de detección de colesterol y proveen la base de un circuito de control homeostático para el mantenimiento de los niveles celulares del mismo (Goto et al. 2013; Desvergne, Michalik, and Wahli 2006). Los LXR inducen la expresión de una gran variedad de genes relacionados con el eflujo de colesterol, por ejemplo transportadores ABC (*ATP binding cassette*) como ABCA1 y ABCG1, y también incrementan el aclaramiento de colesterol al aumentar los niveles plasmáticos de las HDL (Ma et al. 2017). Además, los LXR pueden activar genes de enzimas lipogénicas, como ACC, FAS, GPAT y esteroil-CoA desaturasa (Grønning-Wang, Bindesbøll, and Nebb 2013).

### I.2.4. Metabolismo lipídico en hepatocitos y macrófagos: rol en aterosclerosis

En condiciones normales, el metabolismo del colesterol se encuentra altamente regulado a fin de conservar niveles apropiados del mismo manteniendo su homeostasis celular. En este



proceso el hígado posee un papel central, al participar en la síntesis de colesterol, la remoción de las LDL circulantes en plasma y la excreción de colesterol (Navarro et al. 2009).

Alteraciones en los niveles plasmáticos de lípidos como el colesterol asociado a LDL constituye una de las principales causas por las cuales se desarrolla la aterosclerosis. Ésta es una patología caracterizada por la acumulación de material graso en las paredes de las arterias, seguido por un progresivo deterioro y reducción del flujo sanguíneo debido a un exacerbado proceso inflamatorio que muchas veces puede resultar en la formación de un trombo y la oclusión del vaso (Ross 1999; Lusis 2000).

Como se grafica en la Figura 1.8, durante el proceso de desarrollo de la placa aterogénica los monocitos son reclutados al sitio de la lesión, luego se adhieren al endotelio, y por un proceso de transcitosis migran hacia la capa íntima (X. Zhang, Sessa, and Fernández-Hernando 2018). Por otra parte, las VLDL son convertidas en circulación en LDL, las cuales se infiltran en la capa endotelial y pueden ser oxidadas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) presentes en el espacio subendotelial (Moore and Tabas 2011; Arya et al. 2014). A su vez, ciertas citoquinas allí presentes colaboran en procesos tales como la diferenciación de monocitos a macrófagos y la infiltración de nuevos monocitos a la capa íntima (Hansson 2005). Al sufrir este proceso de diferenciación, los macrófagos incrementan el nivel de expresión de receptores TLR (Toll Like Receptors) y de tipo “scavenger” o “basurero” como los receptores scavenger tipo A y los receptores scavenger tipo B (CD36) que internalizan lipoproteínas modificadas, tales como LDL acetiladas u oxidadas (LDLox). La captación de estas partículas induce la transición de macrófago a célula espumosa (Kunjathoor et al. 2002). Estas células reciben ese nombre debido a su fenotipo caracterizado por la acumulación de múltiples gotas de lípido, organelas dinámicas rodeadas por una monocapa de FL que acumulan lípidos neutros, mayoritariamente EC provenientes de las LDL modificadas y también TAG (Guo et al. 2009). Además del rol de los receptores basurero en este proceso, los TLR del macrófago desempeñan un papel relevante en la respuesta inmune que caracteriza el proceso aterosclerótico, ya que están implicados en la activación de la respuesta inflamatoria en estas células (Tobias and Curtiss 2005).

Así es como se forma la placa aterosclerótica, la cual contiene gran cantidad de células espumosas. El proceso inflamatorio continúa hasta la ruptura de la placa y la formación de un trombo o coágulo. En casos graves, éste puede mediar una oclusión vascular y desencadenar

una trombosis.

Las estatinas son los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de hipercolesterolemias y prevención de aterosclerosis y otras ECV. Sin embargo, la mayoría de los eventos cardiovasculares no son impedidos con estos fármacos, por lo que resulta imperiosa la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antiaterogénico.

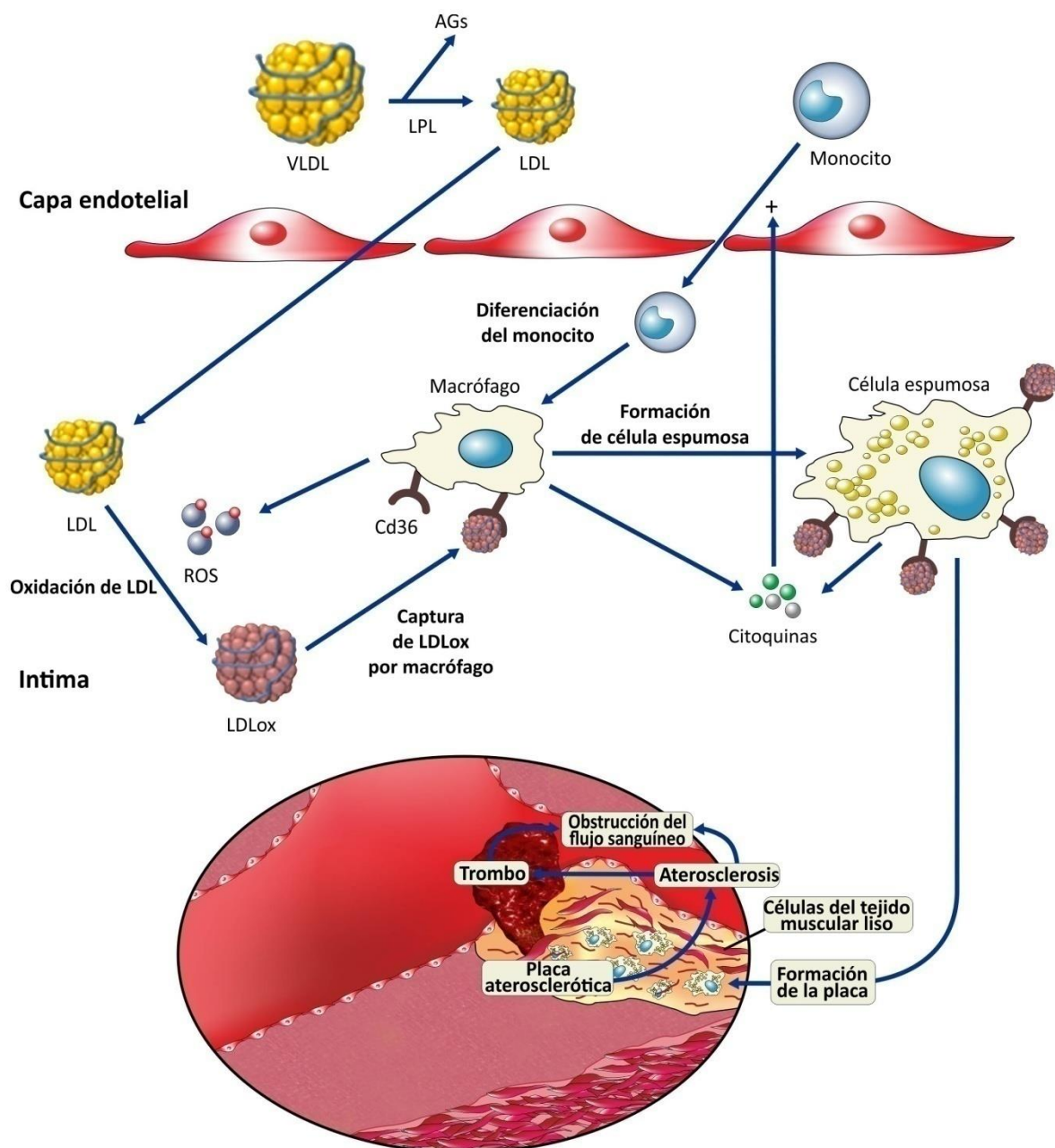


Figura I.8. Mecanismo de formación de placa aterosclerótica. Abreviaturas. VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LPL: lipoproteína lipasa; LDL: lipoproteínas de baja densidad; AGs: ácidos grasos; ROS: especies reactivas de oxígeno; LDLox: LDL oxidadas; CD36: receptor scavenger tipo B.

### **I.2.5. Metabolismo lipídico y su rol en procesos tumorigénicos**

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 and Weinberg 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 las células tumorales (Long et al. 2018). La síntesis *de novo* de los lípidos provee una amplia variedad de moléculas que cumplen diferentes funciones de señalización, modificación postraducciona de proteínas y aporte energético para sostener la continua división celular y facilitar la metástasis (Santos and Schulze 2012; F. Zhang and Du 2012; Huang and Freter 2015).

Como se mencionó anteriormente, la VM proporciona diversas clases de productos como el colesterol, proteínas preniladas, como también esteroides, ácidos biliares, dolicoles, hemo A, ubiquinona e isopentenil adenina (Swanson and Hohl 2006; Buhaescu and Izzedine 2007; Thurnher, Gruenbacher, and Nussbaumer 2013). Las células cancerosas proliferan rápidamente y por lo tanto pueden requerir un aumento de la concentración de todos estos productos para el crecimiento celular óptimo.

Una mayor demanda de colesterol en la célula se abastece con un aumento de la actividad HMGCR y/o una incorporación aumentada de colesterol extracelular a través del LDLR (Espenshade and Hughes 2007). En las células malignas se incrementa el nivel y la eficacia catalítica de HMGCR en comparación con las células normales (Kawata et al. 1990; Harwood et al. 1991). En estas células la HMGCR es resistente a la modulación transcripcional mediada por los esteroides; sin embargo, la regulación postranscripcional de la enzima permanece intacta (Duncan et al. 2004).

Así, en células tumorales, el metabolismo de colesterol se encuentra generalmente desregulado, siendo sus niveles celulares mayores a los de células normales. Entre las distintas funciones que cumple el colesterol, una de las más relevantes para las células tumorales es el

mantenimiento de la organización, estructura y función de las balsas lipídicas (*lipid rafts*). Estas balsas lipídicas son pequeños dominios heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos que se encuentran en la MP y compartimentalizan ciertos procesos celulares (Murai 2015; Brusselmans et al. 2007). Las mismas son conocidas por presentar abundantes cantidades de moléculas de señalización. Receptores de crecimiento, receptores de células T, H-Ras, Akt y Src son ejemplos de proteínas que se encuentran en estos microdominios involucrados en múltiples funciones celulares, incluyendo regulación de la apoptosis, proliferación celular, tráfico de membrana, fenómenos de adhesión y migración celular. La depleción de colesterol en las balsas lipídicas genera cambios en la distribución de las proteínas residentes que da como resultado la pérdida de la función de los receptores o interrupción de los eventos de señalización. Se ha visto que la inhibición de la escualeno sintasa y por ende la síntesis de colesterol, merma principalmente a las balsas lipídicas de colesterol y en menor medida al colesterol fuera de estos dominios (Brusselmans et al. 2007). El hecho de que las células tumorales presenten un incremento de estos microdominios respecto a las normales ha suscitado gran interés en apuntar hacia la regulación de la VM y síntesis de colesterol como una forma de modular a las balsas lipídicas y así prevenir y tratar el cáncer (Murai 2015; Yeganeh et al. 2014; Y. C. Li et al. 2006).

Por otro lado, los grupos prenilo sintetizados también a través de la VM, se unen a pequeñas GTPasas y les permiten el anclaje en la MP (Wright and Philips 2006; Cuello et al. 2013). Las GTPasas (que hidrolizan GTP a GDP), cuando unen GTP, forman un complejo que gatilla cascadas de traducción de señales que promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Las proteínas Ras son las GTPasas más estudiadas y algunas mutaciones específicas resultan en una activación continua de las mismas (Walker and Olson 2005; Swanson and Hohl 2006; Gysin et al. 2011). La presencia de una mutación de Ras en la célula se ha asociado con malignidad debido a la estimulación anómala de las vías lo que contribuye a la oncogenicidad de la proteína. Ras libre en citoplasma es, sin embargo, mitogénicamente inactiva (Walker and Olson 2005; Swanson and Hohl 2006; Gysin et al. 2011). Por lo tanto la síntesis de lípidos como los grupos prenilos FPP y GGPP, así como su unión a determinadas proteínas, cumple un rol fundamental en la activación de estas cascadas de regulación de la proliferación tumoral.

Por otro lado el cáncer no sólo se asocia al crecimiento tumoral que refleja la supervivencia, el

crecimiento y la proliferación celular, sino también al proceso de metástasis que depende principalmente de la migración celular, y la angiogénesis que es el surgimiento de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes. Las GTPasas preñiladas de la familia Rho son bien conocidas como reguladores de ambos procesos. Regulan la migración celular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto, la adherencia célula-célula y la adherencia célula-sustrato (Ridley 2001; Etienne-Manneville and Hall 2002), y son capaces de alterar la expresión y actividad de los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos (Merajver and Usmani 2005; Bryan and d'Amore 2007). Sin embargo, los miembros de la familia Rho también pueden influir sobre la supervivencia celular, el crecimiento y la proliferación, al menos así se ha reportado *in vitro* (Ridley 2004).

Además de los productos de la VM, otros lípidos como AG, FL y esfingolípidos pueden actuar en cascadas de señalización relacionadas con la regulación del ciclo celular y así participar en diversos mecanismos de proliferación celular, transformación y angiogénesis (Scaglia et al. 2014; Obeid, Senkal, and Pulkoski-Gross 2017; Vivanco and Sawyers 2002).

### **I.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo se define como “el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes” (Rodríguez et al. 2004).

El oxígeno es un componente fundamental para la viabilidad celular en los organismos aeróbicos. Bajo condiciones normales en organismos vivos, más de un 90 % del oxígeno consumido se utiliza en la cadena transportadora de electrones. Esto se acopla a oxidación de nutrientes y resulta en producción de energía como ATP, dióxido de carbono y agua. Sin embargo, en ocasiones, las reacciones en las que el oxígeno participa pueden generar ROS. ROS es un término que engloba aquellas especies derivadas del oxígeno que son más reactivas que el oxígeno en sí mismo (Halliwell and Gutteridge 2015).

Tanto fuentes endógenas como exógenas pueden contribuir a la generación intracelular de ROS. Entre las fuentes exógenas se pueden listar radiación UV, rayos X, rayos gamma, contaminantes atmosféricos, sustancias químicas, metales pesados, etc. Las fuentes endógenas incluyen la cadena transportadora de electrones, la actividad de RE y peroxisomas, así como la NAD(P)H

oxidasa (NOX) asociada a membrana (Trachootham et al. 2008).

El término ROS incluye radicales libres derivados del oxígeno, y algunas especies no radicales. Un radical libre es una entidad química con un electrón desapareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes (Rodríguez et al. 2004). La reducción univalente de  $O_2$  genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones produciendo tres compuestos ROS: el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). El  $H_2O_2$  no es un radical libre, pero se incluye en la categoría de ROS por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los radicales libres, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente el  $Fe^{+2}$ ) para producir el  $OH^{\bullet}$ . A su vez, los radicales  $OH^{\bullet}$  son capaces de reaccionar con las biomoléculas produciendo radicales libres orgánicos menos reactivos, como los peroxilos ( $ROO^{\bullet}$ ). El nitrógeno también es capaz de formar radicales libres, las especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Rodríguez et al. 2004).

Los radicales libres son producidos continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula, pero promueven la actividad de diversos mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para contrarrestar la generación de estos metabolitos tóxicos, equilibrar la respuesta oxidante y mantener la homeostasis celular (Figura I.9). Si bien las ROS cumplen funciones importantes a nivel celular, cuando la generación de los mismos supera la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidantes, se desarrolla el denominado estrés oxidativo.

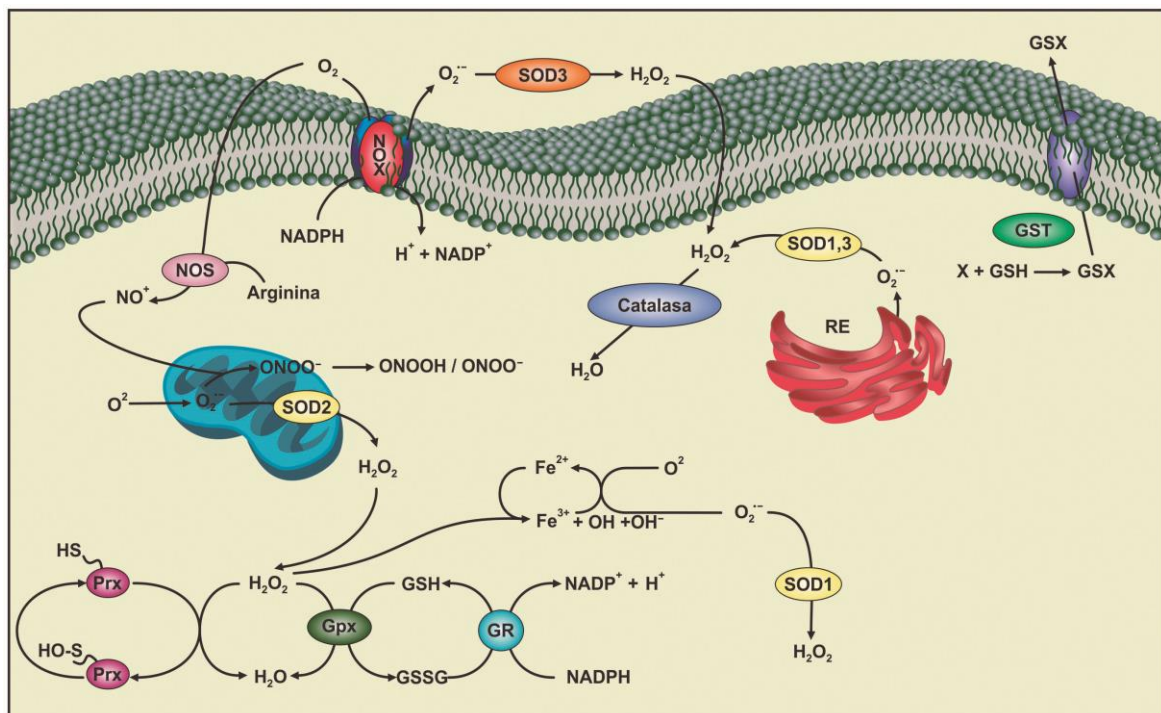


Figura I.9. Generación de especies reactivas intracelulares y mecanismos antioxidantes. Abreviaturas. RE: sistema del retículo endoplasmático; NOX: complejo NAD(P)H oxidasa; NOS: óxido nítrico sintasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: disulfuro de glutatión; Gpx: glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; HO·: radical hidroxilo; NO·: óxido nítrico; ONOO·: peroxinitrito; SOD: superóxido dismutasa; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; Prx: peroxirredoxinas; GST: glutatión S-transferasa; X: xenobiótico.

### Sistemas antioxidantes y mecanismo de acción:

Numerosos resultados, tanto in vivo como in vitro, sugieren que los antioxidantes pueden prevenir o limitar la sobreproducción de radicales libres ejerciendo su acción mediante distintos mecanismos (Jie Sun et al. 2002; Lü et al. 2010):

- Mecanismo SET: muchos antioxidantes actúan como “estabilizadores o apagadores de diversas especies reactivas” lo que se denomina actividad “scavenger” de antioxidantes sobre radicales libres. Los radicales ( $R\cdot$ ) se estabilizan a través de la cesión de un electrón por parte de la molécula antioxidante. El antioxidante, como resultado de ceder un electrón, se convierte en un radical libre y luego termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno.
- Mecanismo HAT: el antioxidante puede estabilizar radicales libres a través de un mecanismo



que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno (esto es un electrón con su protón). En este último caso, el radical libre también queda estabilizado electrónicamente.

Los antioxidantes cuya acción es promovida a través de mecanismos SET y/o HAT son mayoritariamente los antioxidantes no-enzimáticos, sean estos normalmente biosintetizados por el organismo humano, o bien que ingresen al organismo a través de la dieta. La mayor parte de los antioxidantes que actúan a través de estos mecanismos presentan en su estructura química principalmente grupos funcionales hidroxilo fenólicos (por ejemplo, todos los polifenoles y los tocoferoles).

- Prevención de la formación enzimática de especies reactivas: Algunos antioxidantes pueden actuar previniendo la formación de ROS y ERN. Lo hacen inhibiendo, ya sea la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas prooxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, como son la NOX y la óxido nítrico sintasa (NOS), entre otras.
- Activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes: Como parte de la defensa antioxidante, las células animales poseen ciertas enzimas que remueven catalíticamente las especies reactivas como son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión-S-transferasa (GST) y catalasa (CAT) mediante las reacciones mostradas en la Figura I.10:

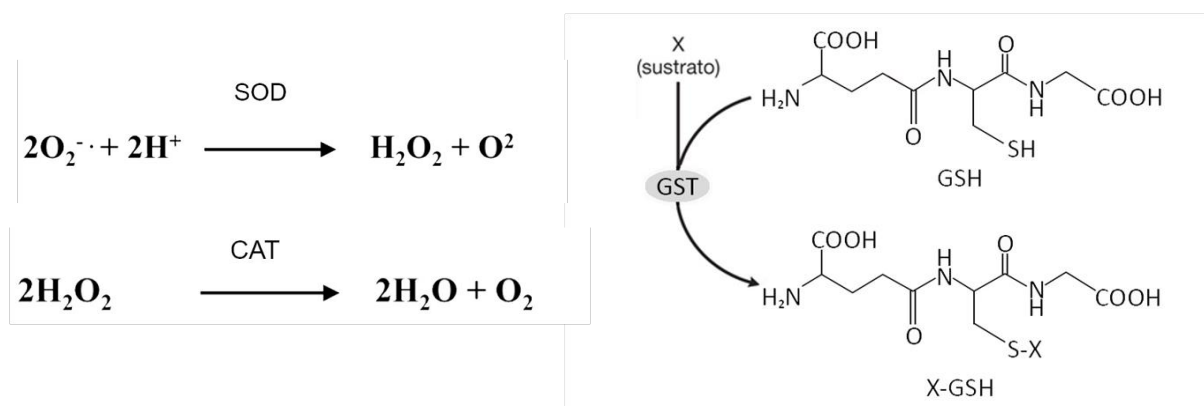


Figura I.10. Reacciones catalizadas por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST).

### I.4. Ciclo celular y apoptosis

En el cáncer, se producen alteraciones fundamentales en el control del ciclo celular y en mecanismos de reparación del ADN, lo que resulta en una proliferación celular desenfrenada y en la invasión de tejidos normales. Las mutaciones ocurren principalmente en dos clases de



## Introducción

genes: proto-oncogenes y genes supresores de tumores. En las células normales, los productos de los proto-oncogenes actúan en diferentes niveles a lo largo de las vías que estimulan la proliferación celular. Las versiones mutadas de proto-oncogenes o los oncogenes pueden promover el crecimiento tumoral. Por otro lado, la inactivación de genes supresores de tumores produce una disfunción de las proteínas que normalmente inhiben la progresión del ciclo celular. La desregulación del ciclo ocurre frecuentemente debido a mutaciones de estas proteínas que se asocian a complejas redes de vías interconectadas como la que se muestra en la Figura I.11, implicadas en la transición del ciclo celular y la apoptosis.

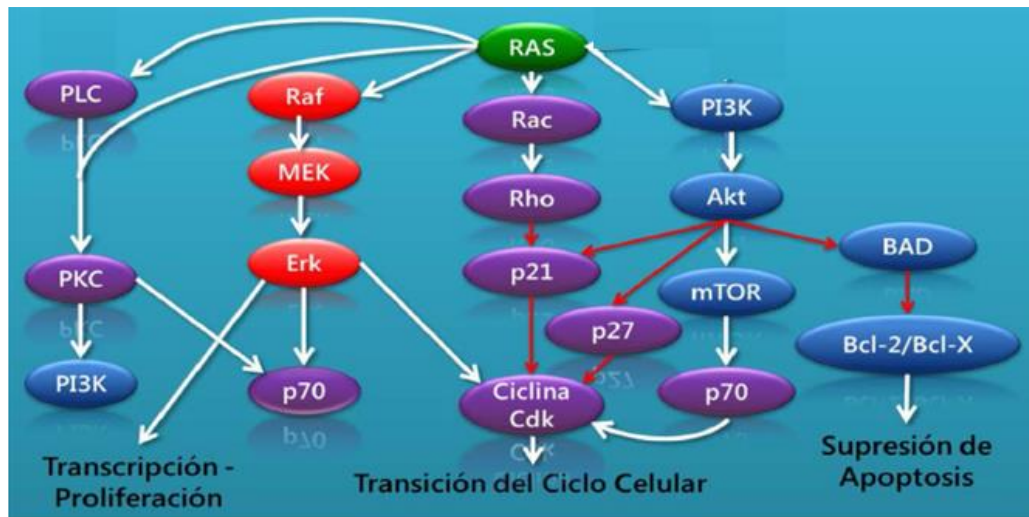


Figura I.11. Esquema simplificado de las principales vías moduladas por Ras y las proteínas efectoras que habitualmente se ven afectadas por mutaciones en desórdenes del desarrollo y cáncer. Las vías Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt son las principales vías desreguladas en células tumorales. Flechas blancas: estimulación; flechas rojas: inhibición. Tomado de (Sandoval Usme 2012).

### Ciclo celular

La división celular consiste en dos procesos consecutivos, caracterizados principalmente por la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas replicados en dos células hijas separadas. Originalmente, la división celular se dividió en dos etapas: mitosis, es decir, el proceso de división nuclear; e interfase, el interludio entre dos fases M. Las etapas de la mitosis incluyen profase, metafase, anafase y telofase. Diferentes técnicas revelaron que la interfase incluye las fases G1, S y G2 (Norbury and Nurse 1992). La replicación del ADN ocurre en la llamada fase S. Esta fase está precedida por una fase o “gap” llamado G1 durante el cual la

## Introducción

célula se está preparando para la síntesis de ADN y se produce la síntesis de proteínas y ARN. A su vez, la fase S va seguida de un “*gap*” llamado G2 durante el cual continúa el crecimiento y la célula se prepara para la mitosis. Las células en G1 pueden, antes de comprometerse con la replicación del ADN, entrar en un estado de reposo llamado G0. Las células en G0 se denominan “quiescentes” y representan la mayor parte de las células que no crecen ni proliferan.

En la mayoría de las células eucarióticas, el sistema de control del ciclo celular regula la progresión del mismo en tres transiciones principales (Figura I.12). La primera transición es el Inicio en las postrimetrías de G1, cuando la célula queda determinada a entrar en el ciclo celular y a duplicar los cromosomas. La segunda es la transición G2/M, en la que el sistema de control desencadena los acontecimientos mitóticos iniciales que conducen a la alineación de los cromosomas en el huso mitótico durante la metafase. La tercera es la transición de la metafase a la anafase, cuando el sistema de control induce la separación de las cromátidas hermanas, lo que conduce a la finalización de la mitosis y la citocinesis. El sistema de control bloquea la progresión a través de cada una de estas transiciones si detecta problemas dentro o fuera de la célula (Alberts 2016).



Figura I.12. Puntos de control del ciclo celular. Tomado de (Alberts 2016).

Los componentes clave del sistema de control del ciclo celular son las proteínas quinasa dependientes de ciclina (Cdk), las cuales dependen de las subunidades ciclina para su actividad (Figura I.13).

## Introducción

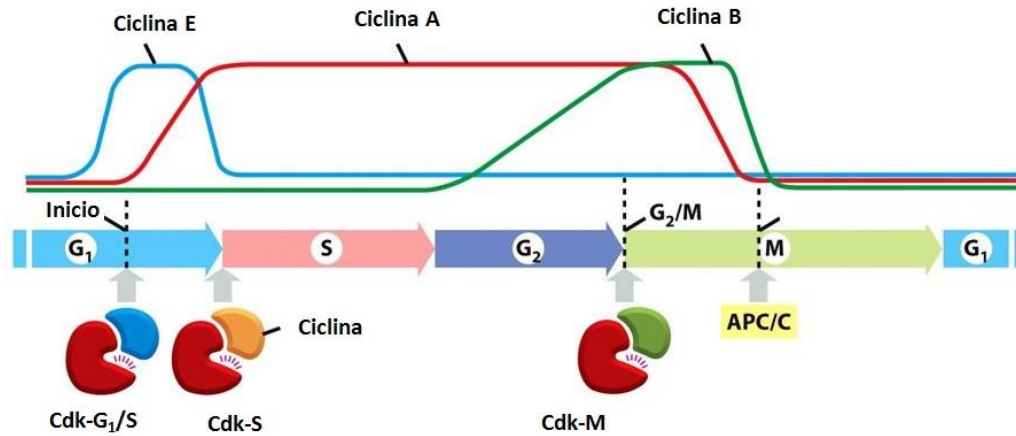


Figura I.13. Sistemas de control del ciclo celular. Tomado de (Alberts 2016).

Los niveles de proteína CDK permanecen generalmente estables, en contraste con las ciclinas, cuyos niveles aumentan y disminuyen durante el ciclo celular. Las oscilaciones de la actividad de los distintos complejos Cdk-ciclina (detallados en la Tabla I.1) regulan diferentes acontecimientos del ciclo celular. Los mecanismos que regulan las actividades de los complejos Cdk-ciclina incluyen principalmente la fosforilación y defosforilación de la subunidad Cdk, la unión de las proteínas inhibidoras de Cdk (CKI) (p16, p21 y p27) y la proteólisis de las ciclinas. El sistema de control del ciclo celular también depende de forma significativa de dos complejos enzimáticos adicionales, el complejo promotor de la anafase (APC/C) y SCF (ubiquitín ligasas), las cuales catalizan la ubiquitinización y consiguiente degradación de proteínas reguladoras específicas que controlan procesos críticos del ciclo (ciclinas y CKI) (Alberts 2016).

Complejo Cdk-ciclina	Ciclina	Cdk asociada
Cdk-G	Ciclina D	Cdk4, Cdk6
Cdk-G <sub>1</sub> /S	Ciclina E	Cdk2
Cdk-S	Ciclina A	Cdk2, Cdk1
Cdk-M	Ciclina B	Cdk1

Tabla I.1. Complejos Cdk-ciclina. Modificado de (Alberts 2016).

### Apoptosis

El término apoptosis fue utilizado por primera vez en un trabajo de Kerr, Wyllie y Currie en 1972 (Kerr, Wyllie, and Currie 1972), para describir una forma bioquímica y morfológicamente

distinta de muerte celular, caracterizada por contracción celular, condensación y fragmentación nuclear, formación de múltiples protrusiones en la membrana y pérdida de adhesión a células vecinas o a la matriz extracelular (Nishida, Yamaguchi, and Otsu 2008). Los cambios bioquímicos incluyen la escisión del ADN cromosómico en fragmentos internucleosómicos, la externalización de FS y la escisión por proteólisis específica de sustratos intracelulares (Martin and Green 1995; Cohen et al. 1994). La apoptosis es un proceso inducido por complejas cascadas de señalización (vías extrínsecas e intrínsecas) que activan una misma caspasa efectora, que desencadena un proceso de muerte celular programada (Ouyang et al. 2012; Elmore 2007). Por ser un mecanismo de muerte regulada, a diferencia de la muerte por necrosis, no produce inflamación lo que resulta muy ventajoso como blanco terapéutico en procesos tumorales.

### **I.5. Aceites de frutos cítricos y plantas aromáticas**

#### **I.5.1. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales (AE), también conocidos como esencias o aceites volátiles o etéricos, son productos naturales formados por varios compuestos volátiles (Sangwan et al. 2001; Hüsni, Başer, and Demirci 2007). Según la Organización Internacional de Normalización de Aceites Esenciales (ISO 9235: 2013) y la Farmacopea Europea (Consejo de Europa 2004), un aceite esencial se define como el producto obtenido de materia prima vegetal mediante hidrodestilación, destilación al vapor o seca, o mediante un adecuado proceso mecánico. Se pueden encontrar en diversos órganos de plantas (flores, frutas, semillas, hojas, tallos y raíces) y son producidos y almacenados en estructuras secretoras que difieren en morfología, estructura, función y distribución (Svoboda, Svoboda, and Syred 2000).

Los AE se caracterizan generalmente por ser líquidos oleosos aromáticos a temperatura ambiente, presentan una densidad menor al agua y son solubles en solventes orgánicos. Los constituyentes de los AE pueden agruparse fundamentalmente en dos clases de compuestos: los terpenos o isoprenoides (componentes mayoritarios) y los fenilpropenos o taninos (presentes en escasa concentración). La biosíntesis de los terpenos involucra a las rutas de mevalonato y del no mevalonato (metileritrol fosfato), mientras que los fenilpropenos se forman a través de la vía del ácido shikimico (Lichtenthaler 1999; Dewick 2002; Hüsni, Başer, and Demirci 2007; Baser and Buchbauer 2015). Estos metabolitos están implicados en las

diversas interacciones entre las plantas, plantas con animales y/o plantas con microorganismos (Burt 2004). Las plantas utilizan los componentes de los AE en la defensa de plagas, de enfermedades, de la invasión de otras plantas, así como en la atracción de insectos y aves (polinizantes). Funcionan también como hormonas, moléculas de señalización, de expresión de genes, en vías de transducción de señales, transporte de electrones o dentro de la maquinaria fotosintética (Holstein and Hohl 2004).

La composición química de los AE depende de numerosos factores, entre los que pueden destacarse: condiciones climáticas, estacionales, geográficas, de crecimiento, lugar de origen, momento de la recolección y técnica de obtención (Bandoni 2003; Panizzi et al. 1993). Las variaciones en estos factores pueden dar como resultado diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición de estos AE.

### **I.5.2. Carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos orgánicos liposolubles del grupo de los isoprenoides. Son sintetizados naturalmente por plantas, algas, algunos hongos y bacterias, y están presentes en muchos alimentos, tales como frutas, verduras y pescado (El-Agamey et al. 2004; Tapiero, Townsend, and Tew 2004).

De acuerdo con su estructura química los carotenoides pueden clasificarse en carotenos y xantófilas. Los carotenos son carotenoides no oxigenados y las xantófilas son carotenoides oxigenados.

En general, los carotenoides pertenecen al grupo de los tetraterpenos, compuestos que poseen una estructura de 40 átomos de carbono. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura: se caracterizan por tener un extenso sistema de dobles enlaces conjugados, denominado cadena poliénica. Esta parte de la molécula conocida como cromóforo es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y, en consecuencia, de su gran capacidad de coloración. Los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Mientras el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza (Rodríguez-Amaya 1999).

### **I.5.3. Relevancia terapéutica de aceites esenciales y carotenoides**

Se han publicado numerosos trabajos donde se evidencia la actividad biológica de los AE dentro de las que se describen actividad antimicótica (Cano et al. 2008), antibacteriana (Martínez et al. 2003) y antiviral (Edris 2007), efecto repelente de insectos (Ricci et al. 2002), antisépticos (Bakkali et al. 2008), antioxidante (Mahmoud 2013) y antihiperlipidémicos (G. Chen et al. 2014). Una de las actividades más estudiadas de los AE es la antitumoral, tanto a nivel de prevención como de tratamiento (D. P. De Sousa 2015), atribuida a las capacidades antimutagénicas, antiproliferativas, de inducción de la detoxificación y del sistema inmune y de modulación de la resistencia multidroga, reportadas para muchos de estos aceites.

Los isoprenoides naturales pueden ser utilizados como drogas hipocolesterolemiantes ya que algunos de ellos son capaces 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 (Peffley and Gayen 2003; Monica P Polo and De Bravo 2006; Crespo et al. 2012). Particularmente, ciertos AE contienen diversos isoprenoides naturales que son capaces de modular la VM ejerciendo un efecto antitumoral (Hardcastle et al. 1999; Afshordel et al. 2015).

Al analizar la actividad biológica de estos aceites, debe tenerse en cuenta que se trata de una mezcla compleja de numerosas moléculas bioactivas que pueden presentar actividad sinérgica entre ellas (D. P. De Sousa 2015; Bakkali et al. 2008), de modo que sus efectos biológicos no siempre resultan de la simple sumatoria de los efectos individuales de cada constituyente (Buchbaure 2000).

Los AE poseen las características ideales que se buscan en los agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos: eficaz actividad antitumoral, disponibilidad comercial, bajo costo, buena biodisponibilidad oral y baja toxicidad. Por estas razones, el estudio de AE como agentes con propiedades anticolesterogénicas y antiproliferativas se ha convertido en un área de gran interés y creciente estudio.

En cuanto a los carotenoides, se ha reportado ampliamente su capacidad como agentes antioxidantes. Particularmente estos pigmentos son bien conocidos por ser scavengers del oxígeno singlete, así como de otras especies reactivas de oxígeno (Fiedor and Burda 2014). Dada esta propiedad, estos compuestos pueden ejercer efectos promotores de la salud, tales como

mejoramiento o potenciamiento del sistema inmunológico y reducción del riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular asociada a la edad (Krinsky and Johnson 2005; Tapiero, Townsend, and Tew 2004; Voutilainen et al. 2006).

### **I.5.4. Aceite de la cáscara de *Citrus reticulata***

La especie *Citrus reticulata* Blanco es un árbol que pertenece a la familia *Rutaceae*. La palabra *Citrus*, proviene del griego, y significa limón, y la palabra *reticulata*, del latín *reticulatus*-a-um, provisto de una retícula, es decir, de la corteza del fruto. Este árbol se conoce popularmente por el nombre de mandarino y sus frutos como mandarina. Se cultiva en países con veranos templados e inviernos suaves, particularmente en países mediterráneos, como China, Japón, Brasil, Argentina, Estados Unidos y Australia (Mazza and Brouillard 1987).

La producción de mandarina en la Argentina se desarrolla principalmente en regiones bien definidas: región NEA (comprende la Región Mesopotámica que abarca las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones), región NOA (integrada por las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca) y nordeste de la Provincia de Buenos Aires (Partidos de San Pedro, Baradero, San Nicolás, Zárate y Ramallo) (Federcitrus 2018).

Dentro de todas las variedades que incluye *Citrus reticulata*, en este trabajo de tesis se empleará la variedad Dancy. Ésta es una fruta mediana, que puede permanecer en la planta hasta por dos meses sin perder su calidad organoléptica. Su pulpa es muy jugosa de color anarajanda y contiene mediana cantidad de semillas. Las plantas son capaces de tolerar el frío, no así la fruta (Federcitrus 2018).

Los principales componentes del aceite analizados en este trabajo fueron extraídos de la cáscara de la mandarina, más precisamente del flavedo de la misma, donde se encuentran glándulas que contienen AE, pigmentos, AG y otros componentes. En la Figura I.14 se señalan las distintas partes de la mandarina.

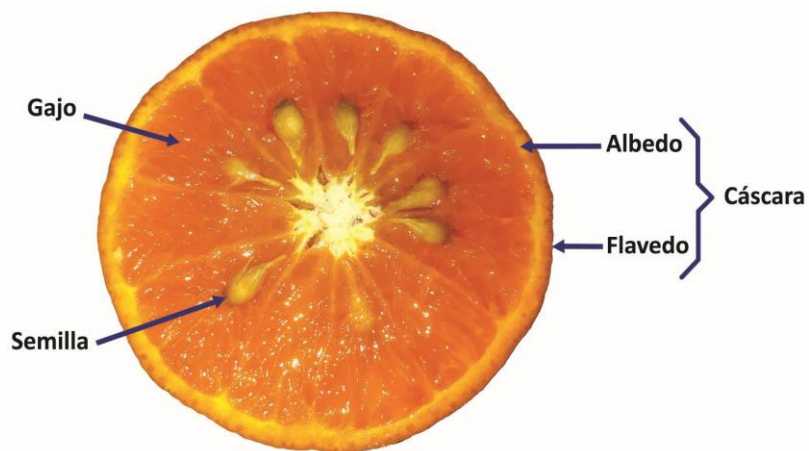


Figura I.14. Fotografía del fruto de *Citrus reticulata* (mandarina) donde se indican las regiones principales del mismo.

Los aceites provenientes de la mandarina pueden obtenerse por diferentes métodos, tales como hidrodestilación, prensado en frío o extracción con solventes orgánicos. Los factores que pueden influir en la composición de estos aceites son: variaciones fisiológicas (estado de desarrollo del órgano, ciclo de actividad del polinizador, tipo de material vegetal, tipo de estructura secretoria, variación estacional, lesiones mecánicas o químicas), condiciones ambientales (clima, polución, enfermedades y plagas, factores edáficos o del suelo), variaciones geográficas, tiempo de cosecha, factores genéticos y evolutivos, método de extracción, forma de almacenamiento, etc (Figueiredo et al. 2008).

Estudios de composición de aceites de cáscara de varios cultivares de *Citrus reticulata* Blanco han demostrado la presencia de limoneno como principal componente,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -pineno, linalool, mirceno y sabineno (Lota et al. 2000; Yu et al. 2009; Njoroge et al. 2006). También se ha reportado y cuantificado el contenido de pectinas, flavonoides y compuestos fenólicos (Y.-C. Wang, Chuang, and Hsu 2008; Y. Zhang et al. 2014).

Varias propiedades del aceite de *Citrus reticulata* han sido descubiertas debido a los efectos que producen sus componentes. Algunas de estas propiedades son: antifúngicos (Chutia et al. 2009), antibacterianos (Jayaprakasha et al. 2000), antioxidantes (Tumbas et al. 2010) y anticancerígenos (Meiyanto, Hermawan, and Anindyajati 2012), etc.

Si bien puede considerarse que muchos AE poseen características ideales para actuar como agentes hipocolesterogénicos y antitumorales, resulta interesante la evaluación de dichas



## Introducción

---

propiedades en el aceite de cáscara de *Citrus reticulata* variedad Dancy, ya que se trata de un producto de origen natural y regional, no utilizado en la industria gastronómica, lo cual le aportaría ciertas características ventajosas, como una reducida toxicidad y bajos costos.

# Capítulo II

## Hipótesis y Objetivos

### II.1. Hipótesis

En nuestro laboratorio hemos demostrado en líneas celulares tumorales, que monoterpenos como geraniol, cineole, limoneno y linalool poseen propiedades hipocolesterogénicas y antiproliferativas y que éstas a su vez son potenciadas de manera sinérgica al combinar los compuestos individuales (Kladniew et al. 2014; Manassero et al. 2013; M P Polo, Crespo, and De Bravo 2011). Por otro lado, existen numerosos reportes bibliográficos acerca del efecto antioxidante que poseen distintos aceites esenciales y/o sus componentes individuales. A partir de estos resultados se plantea que el aceite de la cáscara de mandarina (ACM) de *Citrus reticulata* Blanco variedad Dancy, que posee una mezcla de varios isoprenoides, presenta un gran potencial en el tratamiento de hipercolesterolemias, prevención de aterosclerosis y enfermedades tumorales.

### II.2. Objetivos Generales

- ✓ Aportar conocimientos científicos que demuestren la capacidad que poseen componentes de frutos regionales que no son utilizados en la industria gastronómica (aceites que se extraen del epicarpio o “cáscara” de la mandarina) de modular vías metabólicas lipídicas asociadas al desarrollo de patologías que producen un importante impacto económico y social, tanto a nivel regional como mundial.
- ✓ Evaluar y dilucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares que desencadenan el ACM, a fin de aportar conocimiento sobre su potencial utilidad terapéutica en reemplazo o complemento de terapias existentes en el tratamiento de hipercolesterolemias, prevención de enfermedades cardiovasculares y como quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos.

### II.3. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la composición lipídica del ACM empleando distintas técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.
- ✓ Evaluar el potencial antiaterogénico del ACM mediante:
  - a) estudios de los efectos y mecanismos de acción del aceite sobre la síntesis de lípidos, en particular sobre la vía del mevalonato (vía de síntesis de

- colesterol) empleando precursores radiactivos en un modelo de célula hepática humana (HepG2).
- b) estudios de los efectos del aceite sobre el depósito de lípidos de reserva citoplasmática en células espumosas obtenidas por diferenciación de macrófagos (RAW 264.7) incubados con LDL oxidadas; así como el efecto en los niveles de expresión de enzimas responsables de la síntesis y degradación de los mismos.
  - c) análisis *in vitro* del efecto antioxidante del aceite sobre una de las principales lipoproteínas plasmáticas (LDL) involucradas en el proceso de formación de placas ateroscleróticas.
- ✓ Evaluar el potencial antitumoral del ACM mediante:
- a) estudios de los efectos y mecanismos de acción del aceite sobre la viabilidad, proliferación y muerte celular en un modelo de célula tumoral humana (A549) realizando ensayos bioquímicos-moleculares en células en cultivo (ensayos *in vitro*) e implantadas en ratones atímicos (ensayos *in vivo*).
  - b) análisis del efecto del aceite sobre el estado redox celular evaluando los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de enzimas del sistema antioxidante en células A549.

# Capítulo III

## Materiales y Métodos

### III.1. Reactivos

Los reactivos inorgánicos y solventes de grado analítico se obtuvieron de Merck, Analyticals Carlo Erba y Sigma-Aldrich.

El  $^{14}\text{C}$ -Acetato de sodio (55.3 Ci/mol) se adquirió de Perkin Elmer Life Sciences, Inc.

El limoneno (Li) (98%), los estándares lipídicos y la albúmina sérica bovina (ASB) fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

El medio esencial mínimo de Eagle (MEM), el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y la tripsina fueron provistos por Gibco (Invitrogen Corporation) mientras que el suero fetal bovino (SFB) se adquirió a Natocor (Córdoba, Argentina). La estreptomycin y la penicilina G sódica fueron suministradas por Richet.

### III.2. Obtención del aceite de cáscara de mandarina (ACM)

Las mandarinas fueron recolectadas y seleccionadas en la ciudad de Mocoretá, Departamento de Monte Caseros, provincia de Corrientes, Argentina. La especie utilizada fue *Citrus reticulata* Blanco variedad Dancy.

La extracción del ACM (Figura III.1) se realizó por el método de prensado en frío, el más utilizado a nivel de planta piloto, debido a que minimiza el deterioro de la muestra, previniendo la oxidación de los compuestos.

Se seleccionaron de forma aleatoria y sistemática frutos en completo estado de madurez fisiológica. Las mandarinas seleccionadas fueron lavadas y secadas. Posteriormente, sus cortezas fueron retiradas.

Las cortezas se dispusieron entre dos placas de acero inoxidable frías y fueron sometidas a presión con prensa hidráulica. El extracto crudo fue colectado con pipeta automática de los bordes de las placas y se almacenó en Eppendorfs cubiertos con aluminio y mantenidos en hielo momentáneamente hasta el momento de la centrifugación. Se centrifugó la emulsión aceite-agua liberada a 9000 xg durante 15 minutos a 4°C.

Se trasvasó sólo la fase superior oleosa a un Eppendorf nuevo cubierto con aluminio, el cual se gaseó con  $\text{N}_2$  y se almacenó a 4°C.

Luego de dos semanas se eliminaron los cristales de compuestos de bajo punto de fusión por centrifugación a 11600 xg durante 15 minutos.

El aceite libre de impurezas se fraccionó en viales de vidrio y éstos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera de  $\text{N}_2$  y en oscuridad, hasta su posterior análisis y uso.

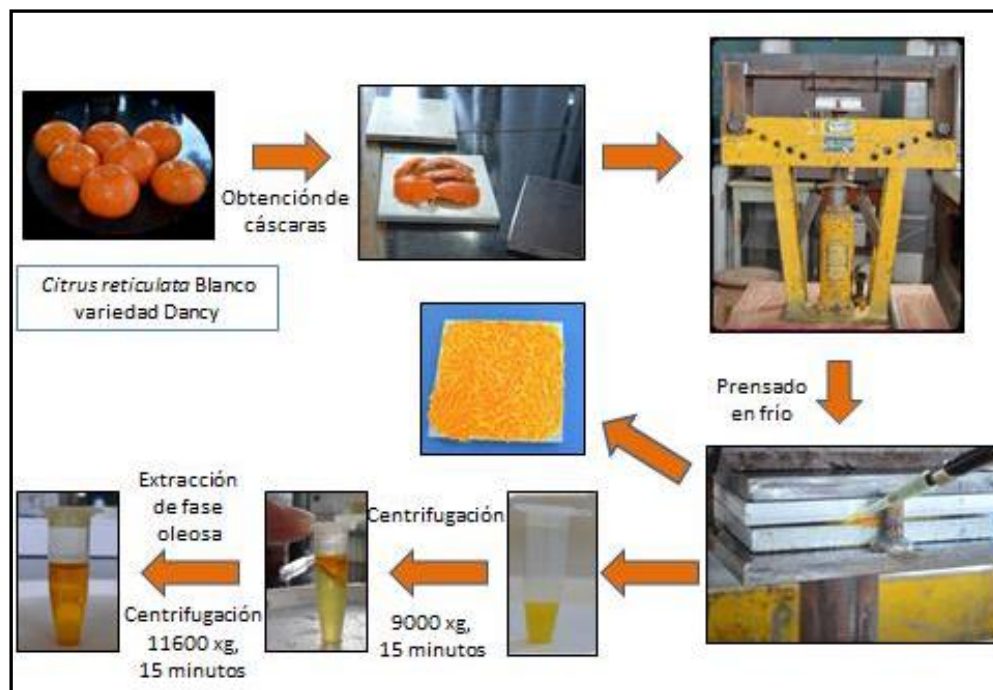


Figura III.1. Etapas del protocolo de extracción del aceite de cáscara de mandarina (ACM). Las cáscaras de mandarina fueron presionadas con prensa hidráulica. El extracto obtenido fue centrifugado y se extrajo la fase oleosa, la cual fue también centrifugada. El ACM obtenido se almacenó en atmósfera de  $\text{N}_2$ , en frío y al abrigo de la luz.

### III.3. Caracterización del ACM

#### III.3.1. Análisis de componentes lipídicos no volátiles del ACM

##### Análisis de componentes lipídicos mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Los componentes lipídicos del ACM fueron separados mediante TLC. Para ello, las placas de sílica gel preparadas en el laboratorio (TLC-Kieselgel 60G, Merck) se secaron en estufa a  $180^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos y luego se sembraron las muestras y estándares “en punto”. Se utilizaron dos mezclas de solventes de corrida: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1), para separar lípidos neutros, y hexano: acetona (80:20), para separar carotenoides. Las corridas de las muestras se compararon con las de estándares comerciales (Vitamina A, Li y TAG).

### Análisis de carotenoides mediante espectrofotometría

Una curva de calibración del carotenoide astaxantina fue preparada a partir de una solución de astaxantina 1 µg/µL. Se prepararon las siguientes concentraciones: 0- 0.01- 0.025- 0.05- 0.1 µg/µL de astaxantina en etanol absoluto. La muestra de ACM se diluyó 1/10 en el mismo solvente. La elección del etanol como solvente se debió a que en él, la muestra produce un máximo de absorbancia a  $\lambda = 478$  nm.

A partir del valor de absorbancia de la muestra de ACM y la curva de calibración de astaxantina obtenida, se determinó la concentración de carotenoides presentes en el ACM.

### Análisis de ácidos grasos

Una muestra del ACM fue procesada a fin de obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG). La composición en AG se obtuvo utilizando un cromatógrafo gaseoso (GC) y la identificación de los mismos se realizó a partir del análisis con el GC-MS (GC acoplado a un espectrómetro de masas).

Una muestra de ACM (3 µL) fue saponificada utilizando una solución de KOH al 10% en metanol para eliminar el colesterol y otros lípidos insaponificables cuya presencia interfiere con el método de análisis de los AG. Este procesamiento se realizó en una placa de calentamiento eléctrico a 80°C durante 1 hora, en tubos de vidrio con tapa esmerilada gaseados con N<sub>2</sub>. Al cabo de ese tiempo se retiraron de la placa de calentamiento, se dejaron enfriar y se extrajeron los lípidos insaponificables tres veces con hexano, desechando la fase superior. Los jabones potásicos de los AG contenidos en la muestra que quedaron en la fase inferior fueron posteriormente acidificados utilizando HCl concentrado. Los AG libres obtenidos fueron extraídos utilizando hexano. Luego de evaporar estos extractos a sequedad, los mismos se trataron con una solución de BF<sub>3</sub> al 10% en metanol, en atmósfera de N<sub>2</sub> y utilizando una placa de calentamiento eléctrico a 80°C durante 30 minutos. Este procedimiento transforma los AG en sus derivados más volátiles, los EMAG, condición necesaria para su posterior análisis por cromatografía gaseosa. Los EMAG finalmente fueron extraídos utilizando hexano y conservando la fase superior. Éstos fueron mantenidos en atmósfera de N<sub>2</sub> para prevenir la oxidación lipídica, hasta su posterior análisis.



### Cromatografía gaseosa

El análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC) de los EMAG fue realizado en un cromatógrafo HP 6890 equipado con un detector de ionización de llama (FID). Las muestras fueron analizadas en una columna capilar Supelco Omegawax 250 (Alltech Associates, Arlington Heights, IL, USA) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor del film. La temperatura inicial de la corrida fue de 175°C, que fue sostenida durante 3 minutos, seguida de una rampa de 3°C/min hasta alcanzar los 230°C, la cual fue sostenida durante 19 minutos. La temperatura de inyector fue de 260°C. La inyección fue realizada en modo Split. Se utilizó Helio como gas portador (1.5 mL/min de flujo constante). La temperatura del detector fue de 270°C. El perfil de AG de cada una de las muestras se obtuvo por comparación de los tiempos de retención relativos de cada uno de ellos respecto de estándares comerciales analizados previamente en la misma columna y en las mismas condiciones de corrida (Supelco 37 Component FAME mix (C4-C24)).

### Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

El análisis por cromatografía gaseosa capilar-espectrometría de masas (CGC-MS) fue realizado en un cromatógrafo HP 6890 acoplado a un detector selectivo de masas 5975C VL Agilent. La columna utilizada para separar la mezcla fue la Supelco Omegawax 250 y la identificación de los EMAG fue realizada por comparación de los espectros obtenidos con la información de las bibliotecas de MS (NIST/EPA/NIH, NIST05). Las condiciones del detector del MS fueron: energía de ionización 70 eV; modo scan en el rango de masas 35-600 uma; línea de transferencia a 260°C; la cámara de ionización a 230°C y el cuadrupolo a 150°C.

### **III.3.2. Análisis de componentes lipídicos volátiles del ACM**

#### Cromatografía gaseosa

El análisis cuantitativo de los compuestos orgánicos volátiles (COV) del ACM (previamente disuelto 1/100 en acetato de etilo) fue llevado a cabo utilizando un cromatógrafo de gases capilar Hewlett Packard 6890 empleando una columna capilar no polar HP-5MS (30 m longitud, 0.25 mm diámetro interno, 0.25  $\mu\text{m}$  espesor del film) (J&W, Folsom, CA, USA) asociada a un FID seteado a 320°C. El inyector operó en modo splitless a 280°C usando Helio como gas portador.

La temperatura inicial de la corrida fue de 50°C, que fue sostenida durante 1 minuto, seguida de una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 300°C, la cual fue sostenida durante 10 minutos. El perfil de volátiles de la muestra se obtuvo por comparación de los tiempos de retención relativos de cada uno de ellos respecto de estándares comerciales analizados previamente en la misma columna y en las mismas condiciones de corrida.

### Cromatografía gaseosa-espectrometría de masas

Los COV fueron obtenidos bajo condiciones de CGC similares con un cromatógrafo gaseoso capilar HP 6890 acoplado a un detector selectivo de masa (Agilent 5975C VL) operado a 70 eV para una mejor identificación. Las muestras se obtuvieron por microextracción en fase sólida en modo espacio de cabeza (HS-SPME). Se acondicionó una fibra de 65 µm de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB, suministrada por Supelco, Bellefonte, PA, USA) y se expuso durante 10 minutos a 1 µL de ACM colocado en un vial de vidrio de 2 mL tapado con un septum de goma y sellado con una cubierta de teflón a 40°C. Los COV fueron identificados mediante la interpretación de su espectro de fragmentación de masas. El espectro fue también comparado con la información de una base de datos de masa comercial (NIST/EPA/NIH, NIST 05) y de la literatura (Adams and Sparkman 2007; Linstrom and Mallard 2001; Ausloos et al. 1999). Las longitudes de cadena de los COV fueron confirmadas mediante el cálculo del índice de Kovats (Kovats 1965).

### **III.4. Ensayos *in vitro***

#### **III.4.1. Líneas celulares utilizadas, condiciones de cultivo celular y tratamiento**

##### **III.4.1.1. Línea Celular A549**

La línea celular A549 (Figura III.2) fue gentilmente donada por la Dra. Amada Segal-Eiras (Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Argentina). Estas células son de tipo adherentes y provienen de un adenocarcinoma bronco-alveolar de pulmón humano. Esta línea fue obtenida por D.J. Giard y colaboradores 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 AG 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, Kuo, and Lin 2004; W. Zhang and Bai 2014). 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).

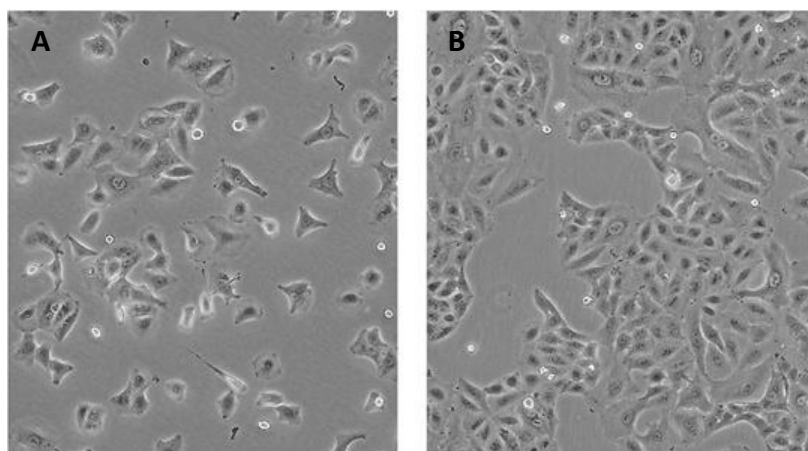


Figura III.2. Células A549 observadas al microscopio óptico en condiciones de cultivo estándar. (A) Células A549 en baja densidad. (B) Células A549 en alta densidad. Aumento 400 ×. Fotografías tomadas de ATCC (ATCC 2018).

### III.4.1.2. Línea Celular HepG2

Esta línea celular de crecimiento adherente (Figura III.3) 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 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, Howe, and Aden 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, y son capaces de expresar HMG-CoA reductasa y lipasas hepáticas. Dado que presentan un alto grado de diferenciación morfológica y funcional, constituyen un buen modelo para el estudio

del tráfico intracelular y de lípidos. 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 hepatocarcinoma (Notas et al. 2006; N. Li et al. 2009; Nguyen, Willmore, and Tayabali 2013).

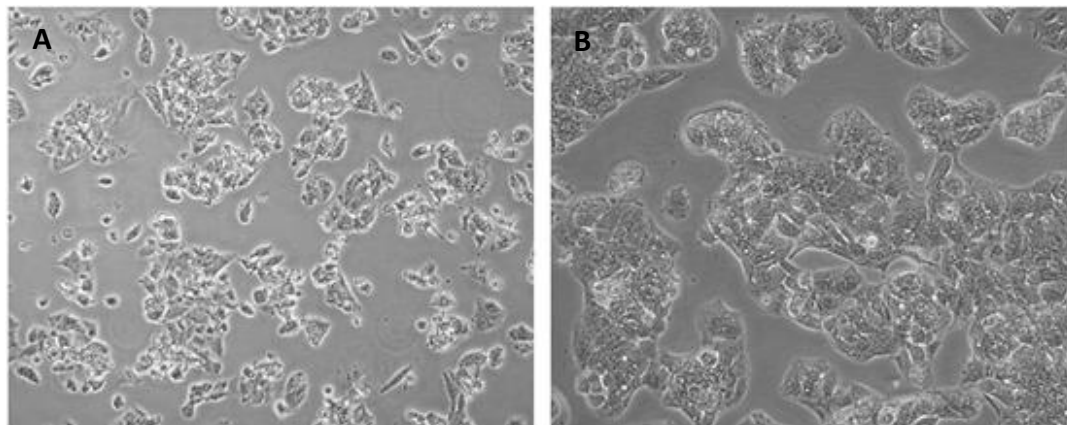


Figura III.3. Células HepG2 observadas al microscopio óptico en condiciones de cultivo estándar. (A) Células HepG2 en baja densidad. (B) Células HepG2 en alta densidad. Aumento 400 ×. Fotografías tomadas de ATCC (ATCC 2018).

### III.4.1.3. Línea Celular RAW 264.7

Esta es una línea monocítica (Figura III.4) que fue obtenida en 1978 a partir de un tumor ascítico inducido por la inyección intraperitoneal del virus de la leucemia de Abelson en un ratón macho adulto BALB/c (*Mus musculus*). Estas células son de crecimiento adherente y huéspedes adecuados para el proceso de transfección. Pueden incorporar el colorante Rojo Neutro por pinocitosis y fagocitar el zymosan (glucano derivado de la pared celular de levaduras utilizado experimentalmente para producir inflamación) (ATCC 2018).

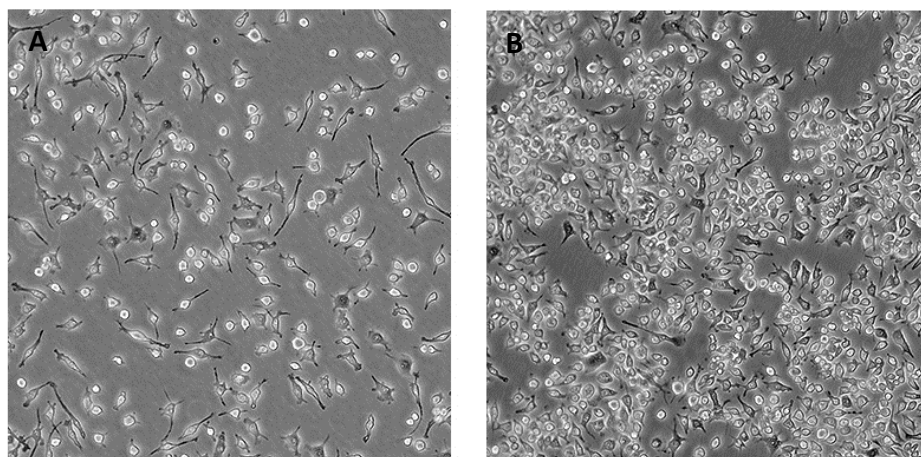


Figura III.4. Células RAW 264.7 observadas al microscopio óptico en condiciones de cultivo estándar. (A) Células RAW 264.7 en baja densidad. (B) Células RAW 264.7 en alta densidad. Aumento 400 ×. Fotografías tomadas de ATCC (ATCC 2018).

### Condiciones de cultivo celular

A549 y HepG2: Estas líneas celulares fueron mantenidas en botellas plásticas de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> de superficie con medio de cultivo MEM (A549) o DMEM (HepG2) esterilizado por filtración y suplementado con 10% (v/v) de SFB, estreptomicina (100 mg/L) y penicilina (67 mg/L). Las condiciones de incubación de los cultivos celulares en estufa gaseada fueron: 5% CO<sub>2</sub> y 37°C. Las células se subcultivaron una vez que llegaron a un estado de confluencia. Para ello, se procedió de la siguiente manera: se descartó el medio de cultivo y se lavó la botella dos veces con buffer fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HSO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Las células se removieron de la superficie incubándolas con tripsina (0.25%, 1 mM EDTA) durante 5-10 minutos en estufa gaseada a 37 °C. Luego se adicionó un volumen de medio de cultivo con SFB por lo menos dos veces mayor al volumen de tripsina añadida con el objetivo de detener su actividad. La suspensión celular resultante fue el material de partida para realizar la siembra en placas multipocillos, de Petri o botellas plásticas, según la necesidad (experimento o mantenimiento).

RAW 264.7: El medio de cultivo empleado para su mantenimiento fue DMEM suplementado con estreptomicina (100 mg/L), penicilina (67 mg/L), HEPES (4 g/L) y SFB al 10% (v/v). A diferencia de las líneas celulares detalladas anteriormente, estas células fueron subcultivadas con *cell scrapers* (Greiner). Como primer paso, las células se lavaron con PBS templado a 37°C y se

adicionaron 2 mL de medio completo fresco. Luego, las placas de 100 mm se rasparon con el *scraper* suavemente para levantar la monocapa y la suspensión celular se dispersó mediante pipeteo. Finalmente, a partir de dicha suspensión se realizó la siembra en placas multipocillos o de Petri dependiendo el objetivo que se tuviera (experimento o mantenimiento)

Los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 fueron transformados en células espumosas mediante la incubación con LDLox (50 µg/mL) en medio de cultivo sin SFB, durante 8/24 horas.

### Tratamiento de las células

Tanto el ACM como el Li fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Analyticals Carlo Erba) 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), a fin de que no resulte tóxico para los cultivos celulares.

En función de los distintos ensayos a realizarse, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (ensayos de MTT, Rojo Neutro y Oil Red O), 6 pocillos (ciclo celular, TUNEL, incorporación de <sup>14</sup>C-Acetato y qPCR), placas de Petri de 100 mm (TBARS y determinaciones enzimáticas) y placas de Petri de 60 mm de diámetro (Western blot).

Debido a que estas líneas celulares presentan diferentes tasas de proliferación, fue necesario ajustar, en ensayos previos del laboratorio, 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% de confluencia al finalizar los mismos.

En los ensayos realizados durante este trabajo, los cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento se incubaron con medio de cultivo suplementado con ACM o Li a las concentraciones pertinentes durante el tiempo estipulado para cada experimento. En cada sección de los resultados se especificará en detalle cada experimento.

### Concentraciones utilizadas

Dado que se trabajó en todos los experimentos con concentraciones de ACM y Li expresadas en µL/L y dichos compuestos tienen densidades (δ) diferentes, a continuación se muestra en la Tabla III.1 de equivalencias los µg/mL que representan cada una de las concentraciones

empleadas.

$\delta$  ACM=0.829 g/mL

$\delta$  Li=0.842 g/mL

$\mu\text{L/L ACM}$	$\mu\text{g/mL ACM}$	$\mu\text{L/L Li}$	$\mu\text{g/mL Li}$
2.4	2.0	2.4	2.0
4	3.3	4	3.4
7.5	6.2	7.5	6.3
8	6.6	8	6.7
15	12.4	15	12.6
20	16.6	20	16.8
25	20.7	30	25.3
30	24.9	37.5	31.6
37.5	31.1	40	33.7
40	33.2	50	42.1
45	37.3	60	50.5
50	41.5	65	54.7
60	49.7	75	63.2
65	53.9	80	67.4
75	62.2	100	84.2
80	66.3	110	92.6
90	74.6	120	101.0
100	82.9	150	126.3
130	107.8	160	134.7
150	124.4	180	151.6
160	132.6	200	168.4
200	165.8	250	210.5
250	207.3	300	252.6
300	248.7	400	336.8
400	331.6	500	421.0
500	414.5	600	505.2
600	497.4		

Tabla III.1. Concentraciones de aceite de cáscara de mandarina (ACM) y limoneno (Li) empleadas en experimentos *in vitro* expresadas en  $\mu\text{L/L}$  y  $\mu\text{g/mL}$ .



### III.4.2. Recuento Celular

Con el objetivo de sembrar una cantidad de células determinada para cada experimento, se procedió a realizar el conteo celular empleando Azul Trypan. Éste es un colorante que se utiliza para diferenciar células vivas de células muertas: las primeras no se colorean debido a que su membrana plasmática es selectiva para ciertos compuestos, en cambio, las segundas pueden incorporar el colorante. De esta manera, se pueden observar al microscopio las células vivas blancas y refringentes y las células muertas teñidas de azul.

Se tomó una alícuota de volumen conocido de la suspensión celular y se diluyó adecuadamente con una solución 0.4% (p/v) de Azul Trypan (Anedra). Esta mezcla se homogeneizó, se colocó en una cámara de Neubauer y mediante la observación al microscopio, se procedió a realizar el conteo de las células totales.

Esta cámara es un portaobjetos que posee dos zonas que se encuentran más deprimidas, en cuyo fondo se ha grabado con un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas (superficie y profundidad), de modo que es posible calcular número de células por unidad de volumen.

Se promedió el número de células viables contadas en los dos cuadrantes y la concentración celular se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$C = N^{\circ} \times 10000 \times \text{dilución}$$

A partir de la concentración celular inicial calculada ( $C_i$ ), la concentración requerida ( $C_f$ ) y el volumen total necesario para la siembra ( $V_f$ ) puede despejarse el volumen de suspensión celular a utilizar ( $V_i$ ):

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = C_f \times V_f / C_i$$

A partir del  $V_i$  y añadiendo el volumen necesario de medio de cultivo, se obtiene la suspensión celular necesaria para la siembra.

### III.4.3. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico para determinar viabilidad celular. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)- 2,5-difeniltetrazol (MTT) por las células que se encuentran activas metabólicamente (Mosmann 1983).

Las sales de tetrazolio (MTT) son especialmente útiles para ensayos de cuantificación de células



viables. La conversión de las sales de tetrazolio (de color amarillo y solubles) a cristales de formazán (de color púrpura azulado e insolubles) sólo se puede producir por la activación de las deshidrogenasas dependientes de NADP(H) o NADH de las mitocondrias de las células vivas. Por lo tanto, la cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se sembraron 15000 células por pocillo (A549), 20000 células por pocillo (HepG2) o 40000 células por pocillo (RAW 264.7) en placas de 24 pocillos. Las células se incubaron con una solución de MTT (Sigma-Aldrich) (0.5 mg/mL en PBS) luego del tratamiento durante 1.5-3 horas (según la línea celular). Las sales de formazán producidas se disolvieron en HCl 0.04 M en isopropanol y la absorbancia se determinó a 560 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

### III.4.4. Ensayo de Rojo Neutro

Este es otro método para medir la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la disminución en la retención del colorante Rojo Neutro (RN) debido a la pérdida de viabilidad celular (Borenfreund and Puerner 1985).

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen ciertos compuestos sobre la integridad de las membranas lisosomales en las células y sobre el control del flujo del colorante a través de las mismas. La acumulación del RN ocurre por el entrapamiento de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido del lisosoma o por unión del RN a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma de células viables; dada la carga positiva, el colorante es incapaz de atravesar las membranas, por lo que permanece retenido. Por el contrario, las células no viables poseen una disminución en la capacidad para asimilar y retener al colorante en el interior de los lisosomas.

Se sembraron 15000 células por pocillo (A549) o 20000 células por pocillo (HepG2) en placas de 24 pocillos. Luego del tratamiento, las células se incubaron con medio de cultivo conteniendo RN (Anedra) (0.05 mg/mL) durante 2-3 horas (según la línea celular). Posteriormente, las células se lavaron con PBS y el colorante se liberó con una solución de extracción del colorante (50% etanol en solución acuosa de ácido acético al 2%). La absorbancia se determinó a 540 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

### III.4.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Éstos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo empleando yoduro de propidio (IP), el cual penetra en células no viables y se intercala en su ADN doble cadena. La cantidad de IP puede ser cuantificada por citometría de flujo. De esta manera, se logró determinar el porcentaje de células de una población presentes en cada fase del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M) en función de la cantidad de IP incorporada.

Se sembraron 150000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Luego de los tratamientos, se descartó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. Posteriormente, se neutralizó la tripsina con medio de cultivo, y se homogeneizó vigorosamente. La suspensión celular se colectó en tubos estériles y se tomó una alícuota para realizar el recuento. Las células se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó PBS frío y estéril para resuspender el pellet por agitación o vortexeo suave. Se centrifugó nuevamente a 500 xg durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió con un volumen de PBS frío para obtener una suspensión de  $1 \times 10^6$  cel/mL. Mientras se agitaba suavemente la suspensión celular, se agregaron por cada 500  $\mu$ L de la misma, 4.5 mL de etanol 70% frío (gota a gota). Se incubó overnight a 4°C. Se tomaron 10 mL (aprox 1000000 células) de suspensión para teñir con IP (Sigma-Aldrich) y el resto se guardó a -20 ° C. Se centrifugó a 500 xg durante 8 minutos. Se descartó el sobrenadante, se agregó PBS y se incubó 15 minutos a 4 °C para que se rehidrate el pellet. Se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó al pellet solución de RNAasa 500 U/mL. Se resuspendió y se incubó durante 15 minutos a 37 ° C. Se adicionó una solución de IP (IP 25  $\mu$ g/mL, Triton X-100 0.1% (v/v) en PBS) y se dejó estabilizar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20-30 minutos y después a 4 ° C 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).

### III.4.6. Técnicas de cuantificación de proteínas

#### Método de Bradford

La unión del cromóforo Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas promueve un corrimiento de su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm generándose un complejo color azul, que puede ser determinado espectrofotométricamente (Bradford 1976). El complejo colorante-proteína se establece muy rápidamente (1-2 minutos) y posee un coeficiente de extinción tal que le confiere gran sensibilidad al método, aunque su dispersión en solución es estable solo por una hora.

Composición de soluciones utilizadas:

- Reactivo de Bradford: Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (0.01% (p/v) en etanol 4.70% (p/v) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 8.50% (p/v) en agua bidestilada).

Este método fue adaptado a micro-método en placas de 96 pocillos. Se colocó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de muestra en cada pocillo y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Luego se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector. La cuantificación de proteínas se obtuvo a partir de una curva patrón realizada con soluciones estándar de ASB (0- 0.2- 0.4- 0.6- 0.8 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sometidas al mismo procedimiento que las muestras.

#### Método de Lowry

Se basa en el desarrollo de un cromóforo de color azul-violáceo cuando reacciona el complejo cobre-grupos aromáticos derivados de los aminoácidos con el reactivo de Folin en medio alcalino (Lowry et al. 1951).

Composición de soluciones utilizadas:

- Solución A: Se disuelven 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  con 4 g de NaOH en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, volumen final: 1 litro.
- Solución B1: Tartrato mixto de potasio y sodio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 2.7% (p/v) en agua bidestilada.

- Solución B2:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% (p/v) en agua bidestilada.
- Solución C: Se mezclaron las soluciones A y B1, y finalmente se agregó solución B2, en una proporción (100:1:1).
- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % (v/v) en agua bidestilada.

Se incubaron las alícuotas correspondientes al estándar de ASB en NaOH 0.1 N ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y de muestra con solución C durante 15 minutos a temperatura ambiente, lográndose así la digestión proteica y la generación del complejo entre el Cu (II) y los enlaces peptídicos en medio alcalino. Luego se adicionó solución D a cada mezcla de reacción, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente 30 minutos, produciéndose la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por acción del complejo cupro-proteínico y generando color. La absorbancia se midió a 750 nm contra blanco (mezcla de reacción que se preparó en conjunto con las muestras a determinar) en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector.

La concentración de proteínas en cada una de las muestras evaluadas se obtuvo empleando la curva estándar de ASB.

### III.4.7. Medición de peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS

#### Procesamiento de muestras de cultivos celulares

Se sembraron 500000 células por placa de Petri de 100 mm de diámetro. Posteriormente a los tratamientos, las células se lavaron al menos dos veces con PBS y se levantaron mediante raspado con *cell scraper*. El contenido se colectó y se centrifugó a 1500-2000 xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en un volumen conocido de PBS y se homogeneizó en un equipo Precytec (Industria Argentina) a potencia 3-4. Se chequeó por microscopio óptico que las células se hayan lisado.

#### Ensayo de TBARS

Uno de los índices que pueden ser utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de la peroxidación lipídica. En este proceso, los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Los peróxidos lipídicos se descomponen y forman compuestos más complejos y reactivos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hydroxynonenal. Estas sustancias se encuentran presentes naturalmente en las especies

biológicas e incrementan su concentración en respuesta al estrés oxidativo. Uno de los ensayos que permite la cuantificación de los productos finales de la peroxidación lipídica es la técnica de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). El MDA predomina como producto final de la degradación de los lípidos y es el principal sustrato de esta reacción. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido en caliente para formar un aducto que puede ser medido colorimétricamente por absorbancia a 540 nm (Ohkawa, Ohishi, and Yagi 1978).

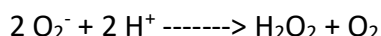
El homogenato obtenido se utilizó para cuantificar TBARS. La reacción se preparó en un medio con Ácido acético 10% (v/v) (pH=3.5), SDS 8.1% (p/v), TBA 1.6% (p/v) y agua bidestilada. Se construyó paralelamente una curva de calibración con cantidades crecientes de una solución de TBARS o MDA (1 µL de solución comercial Sigma-Aldrich (4480 nanomoles/µL) en 50 mL de agua bidestilada). Las muestras y la curva de calibración se incubaron en un baño termostatzado a 95°C durante una hora. Luego, se dejaron enfriar y si las mismas contenían partículas, se centrifugaron durante 10 minutos a 2000-4000 xg para bajar el precipitado. Se midió absorbancia a 535 nm en lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector. Las proteínas del homogenato se cuantificaron mediante el método de Bradford. Los niveles de peroxidación lipídica se expresaron con la siguiente unidad: picomoles TBARS/µg proteína.

### III.4.8. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

#### Superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se puede determinar gracias a su capacidad de inhibir la autoxidación de la adrenalina (Misra and Fridovich 1972). El anión superóxido es un intermediario de dicha reacción.

Adrenalina -----> Adrenocromo

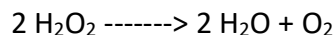


En una cubeta de cuarzo de 1 ml, se tomaron 980 µl de buffer glicina 50 mM (pH=10.2) y se llevó a cero el equipo. Luego, se agregaron 20 µl de adrenalina 60 mM (pH=2) y se determinó la aparición de adenocromo a 480 nm en un espectrofotómetro Helios-β (Thermo). Se calculó la pendiente de ese gráfico. Luego, se realizó el mismo procedimiento pero agregando 10 y 30 µl de muestra. Se volvió a efectuar la lectura y a tomar la pendiente. La actividad enzimática se expresó como U SOD/ mg proteína. Se consideró una unidad de SOD como la cantidad de

enzima necesaria para inhibir el 50% de la formación de adrenocromos autocatalíticos en un minuto.

### Catalasa

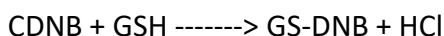
La CAT cataliza la descomposición de peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno.



La actividad de CAT se determinó de acuerdo a lo descripto por Aebi (1984) (Aebi 1984). Se colocó en una cubeta 1 ml de buffer fosfato 50 mM (pH=7) con 20 µl de muestra y el espectrofotómetro Helios-β (Thermo) se llevó a cero. Luego, se agregaron 20 µl de peróxido de hidrógeno 10 mM, y se leyó durante 2 minutos a 240 nm a 25°C. La actividad enzimática se expresó como U CAT/mg proteína. Una unidad de CAT fue la cantidad de enzima requerida para catalizar 1 nanomol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un minuto.

### Glutación-S-Transferasa

La enzima GST cumple la función de detoxificar los peróxidos de tipo orgánico, asemejando su función con la de la glutación peroxidasa Se-dependiente. La actividad de GST se ensayó según lo descrito por Habig y colaboradores (1974) (Habig, Pabst, and Jakoby 1974). Su determinación se lleva a cabo utilizando el reactivo 1 cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB), el cual en presencia de glutación reducido (GSH) forma GS-dinitrobenceno (GS-DNB), que absorbe a 340 nm.



Se colocaron 970 µl de buffer fosfato 100 mM (pH=6.5), 10 µl de GSH 100 mM y 10 µl de muestra en una cubeta 1 ml. El espectrofotómetro Helios-β (Thermo) se llevó a cero. Luego, se agregaron 10 µl de CDBN 100 mM. Se leyó durante 5 minutos a 340 nm. La actividad enzimática se expresó como mili unidades (mU) de GST/mg proteína. Una unidad de GST representó la cantidad de enzima requerida para conjugar GSH con 1 µmol de CDBN en un minuto.

## **III.5. Análisis de lípidos**

### **III.5.1. Ensayos de incorporación de <sup>14</sup>C-Acetato en cultivos celulares**

Se sembraron 150000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Luego de los tratamientos se procedió a la obtención de los lípidos y proteínas celulares.

### Extracción de lípidos y proteínas

Las células (0.5 mg proteína por pocillo) se lavaron con PBS y se extrajeron los lípidos totales con una mezcla de hexano e isopropanol (3:2). Para ello, se adicionaron 2 mL de esta mezcla a cada pocillo, y la placa se agitó suavemente durante 30 minutos. Se colectó el solvente en tubos esmerilados y se procedió a una segunda extracción añadiendo 1 mL de la mezcla a cada pocillo, con agitación suave durante 20 minutos. El contenido total de lípidos en los tubos esmerilados se gaseó con N<sub>2</sub> y se guardó para su posterior análisis. El remanente celular se trató con 2 mL de solución C para extraer las proteínas celulares; la placa se agitó al menos una hora y se guardó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se midió la concentración de proteínas por el método de Lowry.

### Cuantificación de <sup>14</sup>C-Acetato incorporado en lípidos totales

La fase orgánica se llevó a seco con corriente de N<sub>2</sub> y se resuspendió en 1 mL de cloroformo; una alícuota de 10 µL se colocó en un vial de centelleo junto con POPOP Tolueno para determinar la radiactividad total incorporada utilizando un contador de centelleo líquido Wallac 1214 Rack beta (Pharmacia, Turku, Finland). En todos los casos, los resultados (dpm) se normalizaron con los respectivos niveles de proteínas de cada muestra. Luego, los lípidos totales se fraccionaron en alícuotas para distintos procesamiento y determinaciones (lípidos insaponificables, AG, lípidos polares (FL) y neutros, etc).

#### **III.5.1.1. Obtención y separación de lípidos insaponificables, saponificables y ácidos grasos**

##### Obtención y separación de lípidos insaponificables y ácidos grasos

Dos tercios de la fracción de lípidos totales (3 x 10<sup>6</sup> dpm totales) se llevaron a seco con N<sub>2</sub>. Se adicionó 1 mL de una solución de KOH en metanol al 10% (p/v) y se saponificó a 80°C durante una hora. Luego, se realizaron tres extracciones de la fracción insaponificable con 2 mL de hexano cada vez.

Finalmente, se agregó 1 mL de HCl concentrado y se obtuvo la fracción saponificable mediante tres extracciones con 2 mL de hexano cada vez.

Una vez realizadas las extracciones, tanto para los lípidos insaponificables como para la fracción saponificable, se determinó la radioactividad total incorporada.

Las distintas especies lipídicas presentes en la fracción insaponificable se separaron por TLC en placas de sílica gel (activadas previamente a 100-120°C durante 1 hora) en una cuba saturada con cloroformo 100%. Se sembraron también los siguientes estándares: Colesterol, Lanosterol, Escualeno, Dolicol y Ubiquinona. La cromatografía se desarrolló hasta que el frente de corrida alcanzó 1 cm por debajo del borde superior de la placa.

Con el objetivo de separar los AG en función de su grado de saturación, se procedió a realizar el siguiente procesamiento. La fracción saponificable se secó con corriente de N<sub>2</sub>. Luego se adicionó 1 mL de una solución de BF<sub>3</sub> en metanol al 20% (p/v) y 1 mL de metanol, y se esterificó a 80°C durante una hora. Posteriormente, se realizaron tres extracciones con 2 mL de hexano cada vez. Se obtuvieron así los EMAG en 6 mL de hexano, a los cuales también se les midió la cantidad de marca radiactiva incorporada.

Una vez obtenidos los EMAG, se separaron los AG (saturados e insaturados) por TLC. Para ello, las placas de sílica gel se activaron a 100-120°C durante 30 minutos. Posteriormente, éstas fueron impregnadas con una solución de AgNO<sub>3</sub> en acetonitrilo 10% (p/v) en forma de spray, y se procedió a una segunda activación por 20 minutos más. Finalmente se sembraron las muestras y la corrida fue de doble desarrollo en una cuba saturada con una mezcla de hexano, dietil éter y ácido acético (94:4:2) y en oscuridad. La primera corrida se realizó hasta unos 5 cm del borde superior de la placa; la placa se retiró de la cuba y se secó bajo N<sub>2</sub>. La segunda corrida se desarrolló hasta 1 cm del borde superior de la placa.

### Separación de fosfolípidos y lípidos neutros

Un tercio de los lípidos totales se sometieron a dos corridas por TLC consecutivas empleando dos sistemas diferentes de solventes como fase móvil. Las placas de sílica gel se activaron a 100-120°C durante 1 hora. Se sembraron los siguientes estándares: EC, TAG, AG libres, CL, DAG, Cardiolipina, FE, FS y FC.

Fosfolípidos: los lípidos totales se separaron en una cuba saturada con una mezcla de cloroformo, metanol, ácido acético y agua (50:37.5:3.5:2). La cromatografía se detuvo cuando el frente de corrida, en el cual se encontraban los lípidos neutros, alcanzó la mitad de la placa (25-30 minutos).



Lípidos neutros: la placa fue sometida a una segunda corrida con la mezcla hexano, éter etílico y ácido acético (80:20:1). La cromatografía se realizó hasta que el frente de corrida alcanzó 1 cm por debajo del borde superior de la placa.

### III.5.1.2. Revelado de marca radiactiva

La incorporación de radiactividad en las distintas especies antes mencionadas se detectó por autorradiografía, exponiendo las placas sobre una pantalla Storage Phosphor Screen, GE Healthcar. La exposición duró entre 3 y 48 horas, dependiendo de la cantidad de cuentas sembradas. Por último, la pantalla se escaneó en el equipo Storm 840 PhosphorImager (Amersham Pharmacia Biotech).

El análisis densitométrico de las bandas reveladas se realizó utilizando el software Image J 1.46r y los lípidos presentes se identificaron por comparación con estándares sembrados junto a las muestras (Figura III.5).

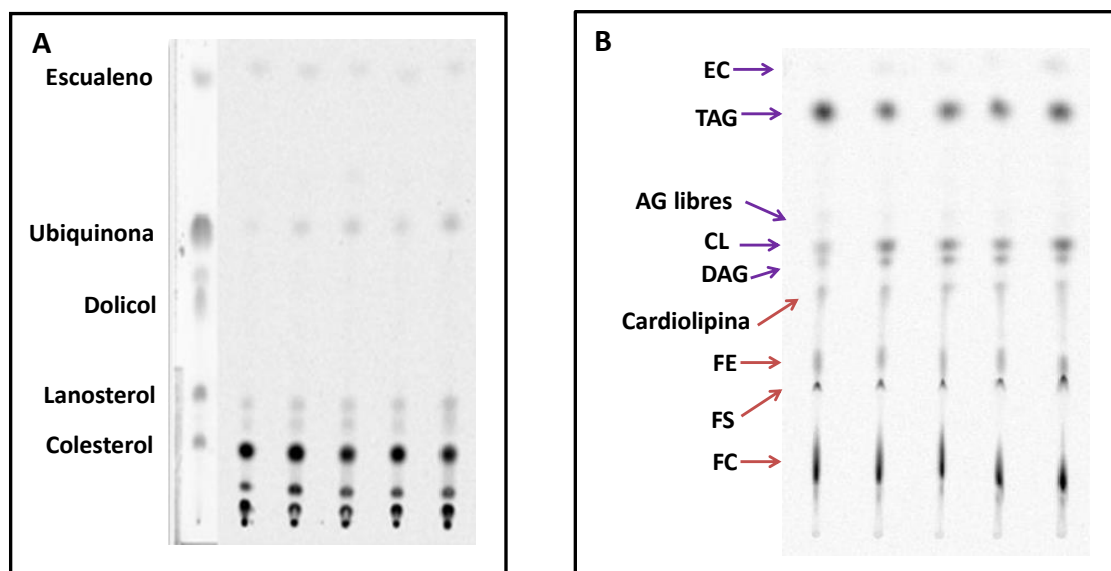


Figura III.5. Lípidos insaponificables (A) y lípidos neutros y fosfolípidos (B) fueron separados por TLC y revelados por autorradiografía; los mismos se identificaron por comparación con estándares. Abreviaturas. EC: ésteres de colesterol; TAG: triacilglicéridos; AG libres: ácidos grasos libres; CL: colesterol libre; DAG: diacilglicéridos; FE: fosfatidiletanolamina; FS: fosfatidilserina; FC: fosfatidilcolina.

### III.6. Ensayos en macrófagos

#### III.6.1. Obtención y oxidación de LDL

Se utilizó plasma donado por el Banco de sangre del Instituto de Hemoterapia de la Plata. Las LDL se aislaron del plasma, colectado en EDTA (1 mg/mL), por ultracentrifugación preparativa (176700 xg durante 44 horas a 10°C). Se separaron las proteínas de la zona superior y se purificaron las LDL en columna Sephacril S300. Éstas se dializaron contra solución salina-EDTA (NaCl 0.85% (p/v), EDTA 0.01% (p/v), pH=7.4) durante 24 horas; posteriormente fueron filtradas y almacenadas a 4°C bajo N<sub>2</sub> en oscuridad. Las LDL fueron oxidadas en un sistema libre de células usando CuSO<sub>4</sub> 5 µM en PBS a 37°C; la oxidación se detuvo por refrigeración y adición de EDTA 200 µM e hidroxitolueno butilado (BHT) 40 µM. Finalmente, la verificación del estado de oxidación se realizó mediante el ensayo de TBARS.

#### III.6.2. Diferenciación de macrófagos RAW 264.7 a células espumosas con LDL oxidadas

Con el objetivo de chequear la diferenciación de macrófagos a células espumosas, se realizó la técnica de Oil Red O. Para ello, se sembraron 200000 células por pocillo sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos. Posteriormente al tratamiento con LDLox durante 8 o 24 horas, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) en PBS durante 1 hora. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS. La tinción se realizó utilizando 6 mL de una solución stock de Oil Red O (0.5 g en 100 mL de isopropanol) con 4 mL de agua destilada. Esta solución de trabajo se preparó fresca cada vez y se filtró dos veces con papel Whatman #1. Luego de 20 minutos de incubación con el colorante, las células se lavaron una vez con isopropanol 60% durante 10 segundos y de tres a cinco veces con PBS. Finalmente, se procedió al montaje en portaobjetos con PBS-glicerol 1:1 y sellado, para la toma de fotos en un microscopio Olympus BX51 (Tokio, Japón), asociado a una cámara digital Olympus DP70 (aumento 600 ×).

#### III.6.3. Cuantificación del contenido de gotas lipídicas

Se sembraron 40000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, y luego de los tratamientos se realizó la fijación y la tinción según el procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente se agregaron 0.3 mL de isopropanol por pocillo para extraer el colorante incorporado en las células. Después de 30 minutos de extracción con agitación, se procedió a medir la cantidad de

colorante liberado cuantificando la absorbancia a 490 nm en lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector. Los niveles proteicos de cada muestra fueron cuantificados por el método de Lowry. Los resultados se expresaron como unidades de Abs 490/ $\mu$ g de proteína.

### III.6.4. Cuantificación de ARNm mediante Real Time RT-PCR

Con el fin de evaluar la expresión de distintos genes relacionados al metabolismo lipídico a nivel transcripcional se sembraron 200000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, se procedió a realizar los respectivos tratamientos con el ACM y el Li y a procesar las muestras como se detalla a continuación.

#### Extracción de ARN

Luego del período de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, cosechadas con 1 ml de TransZol (TransGen Biotech Co.) y guardadas a -70°C.

Al momento de extraer el ARN, las muestras se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo y se homogeneizó 20-25 veces por inmersión. Se dejó reposar 10 minutos y se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se volvió a repetir otra extracción con cloroformo como se describió anteriormente. Se extrajo la fase acuosa, a la cual se adicionó 500  $\mu$ L de isopropanol, se homogeneizó por inmersión 20-25 veces, y se dejó reposar 10 minutos. Se centrifugó nuevamente a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó por inmersión y el pellet se lavó con 750  $\mu$ L de etanol 75%, se levantó con vortex, y se centrifugó a 7000 xg durante 5 minutos a 4°C. Este lavado se repitió de 2 a 3 veces. El pellet se secó en una placa de calentamiento a 65 °C durante 10 minutos. Finalmente el precipitado se enfrió en hielo y se resuspendió en agua con DEPC (dietilpirocarbonato) estéril. El ARN obtenido se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm, utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), el cual determinó no sólo su concentración sino también la relación Absorbancia 260/Absorbancia 280, la cual fue útil para chequear la pureza del ARN aislado (respecto a la presencia de proteínas). Se consideró como adecuado un cociente 260/280 > 1,8. Todas las muestras fueron tratadas con Desoxirribonuclease I libre de RNasa (Kit DNasa I, Fermentas) para eliminar el ADN que pudiera haber quedado en la muestra. Para ello se tomaron 9  $\mu$ L muestra RNA, los cuales fueron incubados con 1  $\mu$ L buffer 10X con  $MgCl_2$  y 1  $\mu$ L DNasa, a 37°C durante 30 minutos. Luego se cortó la reacción adicionando 0.5  $\mu$ L de EDTA 50

mM e incubando a 65°C durante 10 minutos.

Con el objetivo de determinar la calidad y la pureza del ARN obtenido, se corrió en un gel 1% de agarosa (30 mL del buffer TBE (Tris 0.05 M, Ácido Bórico 0.05 M y EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 mM) 1X + 0.3 g de agarosa (BIO RAD) + 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich)). Las muestras se prepararon en la siguiente proporción: 1  $\mu\text{L}$  de loading buffer 6X, 3  $\mu\text{L}$  de agua con DEPC estéril y 2  $\mu\text{L}$  de ARN. Éstas se sembraron en el gel, el cual se corrió en una cuba electroforética horizontal con TBE 1X a 100 volts durante 20 minutos. Las bandas obtenidas se observaron con un transiluminador Hoefer Macrovue UV-20 y se tomaron fotos con una cámara Kodak DC 210 (Nueva York, EEUU) y el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, LP). Se evaluó la presencia de las bandas de ARN 28S y 18S, siendo la intensidad de la primera el doble de la segunda, y de ADN contaminante. Sólo se trabajó con las muestras cuya corrida electroforética resultó satisfactoria.

### Obtención del ADN complementario (ADNc): Retrotranscripción

El ADNc fue obtenido empleando el kit iScript cDNA Synthesis (BIO RAD). Se utilizaron 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa y 4  $\mu\text{L}$  del mix de reacción. Se calculó el volumen requerido para retrotranscribir 500 ng de ARN, según la concentración de cada muestra calculada por el NanoDrop. El resto del volumen se completó con agua libre de nucleasas. El volumen final de la mezcla fue de 20  $\mu\text{L}$ . Luego de un spin-down, las muestras se incubaron en las siguientes condiciones de temperatura: 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C y 1 minuto a 95°C, en un termociclador Veriti (Applied Biosystems).

### Chequeo de transcripción reversa y amplicones

Con el fin de determinar si la retrotranscripción fue correcta, si los primers se adherían adecuadamente y si el tamaño de los ADNc era el esperado, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADNc se incubó con los reactivos necesarios (Inbio Highway) tal como se indica en la Tabla III.2.

Reactivos	Vol (μL)
Buffer	1
MgCl <sub>2</sub>	0.6
dNTPs 250 μM	0.2
Primers 10 pmol/μL (Forward y Reverse)	1
Taq Polimerasa	0.1
H <sub>2</sub> O	6.1
ADNc (dilución 1/10)	1
Volumen Final	10

Tabla III.2. Reactivos requeridos para PCR.

Las muestras se incubaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) y fueron sometidas al siguiente programa de temperaturas: un ciclo a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, y finalmente un ciclo a 72 °C por 4 min.

El tamaño de los productos de PCR se determinó en un gel 1% de agarosa en TBE con bromuro de etidio. Las bandas de ADN se observaron a la luz UV, y su peso se comparó con un patrón de peso molecular de 100 a 2000 pb (PB-L Productos Bio-Lógicos).

### PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para cuantificar la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los genes de interés se utilizó el método de qPCR a partir de ADNc. Los genes a estudiar fueron: CD36, GPAT3, CPT1 y β-actina (gen de referencia). La secuencia de los primers empleados se detalla en la Tabla III.3.

Primer	Secuencia
<b>CD36</b> Forward	TGTAGCAGCTGCACCACATA
<b>CD36</b> Reverse	TGGAACCAAAGTGAAGGAATGGA
<b>GPAT3</b> Forward	CTTTGAAATCGGAGGAACCA
<b>GPAT3</b> Reverse	TTTGCAAAGTGAAGTGCCTC
<b>CPT1</b> Forward	CACTGCAGCTCGCACATTAC
<b>CPT1</b> Reverse	CTCTGCTCTGCCGTTGTTGT
<b>β-Actina</b> Forward	AAGAGCTATGAGCTGCCTGA
<b>β-Actina</b> Reverse	TACGGATGTCAACGTCACAC

Tabla III.3. Primers utilizados para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Como primer paso, se realizó una curva de eficiencia para determinar la dilución óptima del templado de las muestras a utilizar en la qPCR. Se prepararon diluciones de un pool de ADNc (1/5, 1/15, 1/45, 1/135 y 1/405) y se empleó el kit iQ SYBR Green Supermix (BIO RAD). Los volúmenes de cada componente necesario para la reacción se detallan en la Tabla III.4.

Reactivos	Vol (μL)
iQ SYBR Green Supermix	7.5
Primers 1.5-3 μM (Forward y Reverse)	1.5
H <sub>2</sub> O	3.5
Pool ADNc (dilución)	2.5
Volumen Final	15

Tabla III.4. Reactivos requeridos para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

El programa de temperaturas utilizado en el termociclador AriaMx G8830A (Agilent) puede observarse en la Figura III.6. La curva de eficiencia para cada gen se construyó y analizó a partir del software Aria v 1.6 (Agilent).

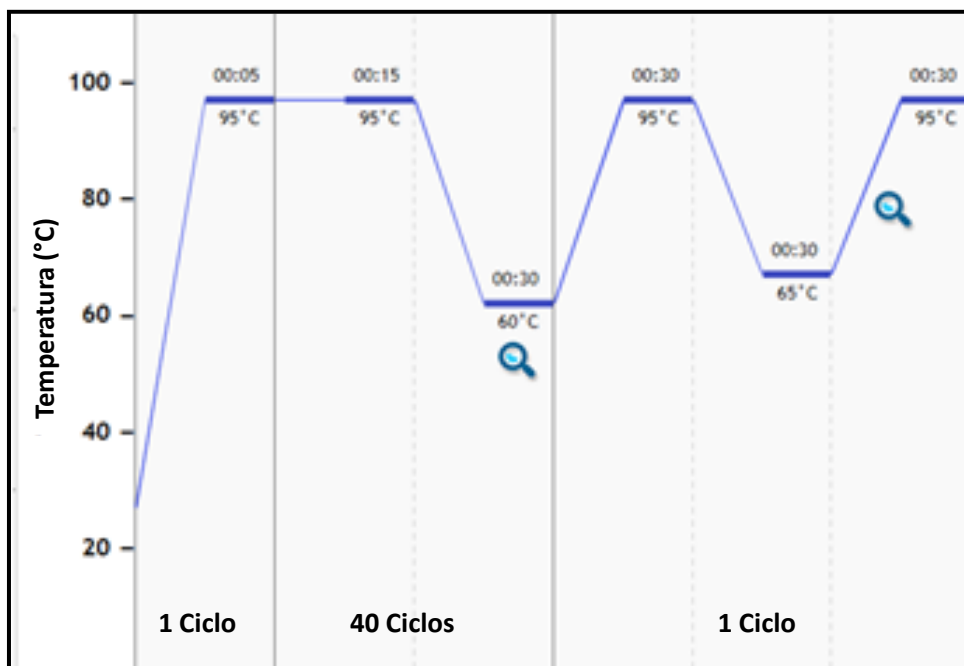


Figura III.6. Programa de temperaturas aplicado en qPCR.

En función de los resultados de la curva de eficiencia, se determinó la dilución óptima del ADNc (1/3-1/4) y la eficiencia de los primers (93-100%). A partir de esta información, se procedió a realizar la qPCR de todas las muestras a analizar con los respectivos primers.

En todos los casos se realizaron los controles de NRT (ARN en lugar de ADNc) y de primers (H<sub>2</sub>O con DEPC en lugar de ADNc).

La cantidad relativa de ARNm de cada gen de interés se calculó utilizando el software qBase v 1.3.5 y se normalizó al ARN de  $\beta$ -actina.

### III.7. Ensayos *in vivo*

#### III.7.1. Condiciones de mantenimiento de los animales

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones NIH hembras portadores del genotipo nu/un inmunodeficientes.

Animales de aproximadamente un mes de edad, fueron provistos por el bioterio del Centro Atómico Ezeiza (CNEA) y criados en nuestro bioterio que se halla especialmente equipado (cabina de flujo laminar horizontal, luz UV, ropa y elementos estériles) para garantizar las condiciones de asepsia necesarias, en ambiente climatizado y con ciclos de luz (6 a.m. a 6 p.m.)

y oscuridad (6 p.m. a 6 a.m.) controlados en forma automática. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio para roedores esterilizada con autoclave, cuya composición se detalla en la Tabla III.5. Se les permitió libre acceso al consumo de agua esterilizada en autoclave.

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

Tabla III.5. Composición de dieta estándar de laboratorio para roedores. \*Valores mínimos. \*\*Valores máximos

### III.7.2. Desarrollo y mantenimiento de tumores provenientes de la línea A549 en ratones nude

La condición atímica de los ratones nude conduce a un profundo déficit de la inmunidad adaptativa lo cual permite la aceptación de heterotransplantes (Rygaard and Poulsen 1969; Manning, Reed, and Shaffer 1973) y transforma a estos animales en huéspedes ideales para el desarrollo de líneas tumorales humanas.

Cultivos de células A549 fueron lavados con PBS estéril y tripsinizados. Las células se resuspendieron en MEM sin SFB y se inyectaron subcutáneamente en el espacio interescapular de los ratones nude (aprox  $10^7$  células/ratón). Luego de 8 semanas se observó la aparición de los tumores primarios en la zona de implantación. Dichos tumores fueron mantenidos por repiques sucesivos en los animales, los cuales fueron repetidos cada dos meses. Para ello, se sacrificó al animal y se removió el tumor, el cual se lavó con solución fisiológica estéril y se eliminaron las zonas necrosadas del mismo. Se cortó en pequeños fragmentos con tijera y se desintegró con mortero y pilón. Luego, el tejido se pasó por una malla de acero de 1 mm<sup>2</sup> junto con MEM, obteniéndose de este modo una suspensión de 300 mg de tejido/mL. Finalmente, los ratones fueron inoculados con 0.2 mL de dicha suspensión en la zona descrita. En todos los



casos en los que el implante resultó exitoso el desarrollo de tumores pudo ser evidenciado entre los 20 y 30 días siguientes a la inoculación (Figura III.7).

De acuerdo a lo observado en estudios previos (Manning, Reed, and Shaffer 1973) y a la experiencia en nuestro laboratorio la inoculación subcutánea de A549 no produce metástasis.



Figura III.7. Ratón nude con tumor inducido por la inyección subcutánea de células A549 en el espacio interescapular.

### III.7.3. Preparación del alimento suplementado con ACM

Debido a que la inyección y/o alimentación forzosa con sonda produce un gran estrés en los animales, el ACM se administró por vía oral, siendo éste incorporado al alimento.

Las dosis de ACM administradas con el alimento a ratones nude fueron calculadas correlacionando los datos de inhibición del ACM sobre la proliferación de células A549, de la ingesta de alimento diario de los animales y de la fisicoquímica del ACM, con datos previos reportados en nuestro laboratorio (Galle et al. 2014).

Según las dosis a utilizar, se diluyeron cantidades adecuadas de ACM en cloroformo. Cada dilución se resuspendió debidamente y se agregó gota a gota a cada grano de alimento balanceado. Éste se dejó toda la noche en una cabina de flujo laminar a fin de evaporar el solvente.

### III.7.4. Evaluación de parámetros morfométricos

#### Medida del volumen tumoral

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño fácilmente palpable, éstos fueron medidos dos veces por semana con calibre, tomando el largo, como el lado con mayor longitud, y el ancho, como el lado con menor longitud, independientemente de la variación en la forma del crecimiento del tumor. El volumen tumoral fue calculado según la fórmula de un elipsoide:

$$V = a^2 \cdot b / 2$$

Donde a y b son el ancho y el largo del tumor, respectivamente, ambos expresados en milímetros. En general, el tamaño de los tumores fue expresado como volumen total (en mm<sup>3</sup>) o como volumen relativo; este último se calculó según la fórmula  $V_i/V_0$ , donde  $V_i$  es el volumen medido al tiempo i, y  $V_0$  es el volumen tumoral medido al tiempo 0 (inicio del experimento).

#### Peso de los animales

El peso de los animales fue registrado junto con las medidas del volumen tumoral. Los animales fueron retirados de sus cajas utilizando guantes y depositados sobre un recipiente estéril para ser pesados con balanza electrónica Scout Pro (Ohaus).

#### Peso de los órganos

Algunos órganos fueron extraídos durante la necropsia: hígado, bazo, riñón e intestino. Los mismos fueron lavados con solución fisiológica estéril y se pesaron en balanza electrónica Scout Pro (Ohaus). El pesaje de dichos órganos, junto con el pesaje de los animales al momento del sacrificio, se utilizaron para determinar parámetros morfométricos.

#### Peso del alimento no ingerido

Durante los 21 días de tratamiento, se registró diariamente el peso del alimento remanente que los animales no ingerían. El alimento se depositó sobre un recipiente estéril y se pesó con balanza electrónica Scout Pro (Ohaus). De esta manera, pudo calcularse la cantidad de alimento ingerido por día de cada grupo de ratones.

### III.7.5. Estudios histopatológicos

#### Armado de tacos de parafina, obtención y tinción de los cortes de tejidos

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removieron rápidamente los órganos y tumores, los cuales se lavaron con solución fisiológica y se colocaron en formol tamponado al 10% (formol 10% (v/v),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.029 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.046 M) durante 24 horas para su fijación. Luego, se procedió a realizar el taco de parafina del siguiente modo:

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

Se realizaron cortes de un espesor de 3  $\mu\text{m}$  aproximadamente, se colocaron en portaobjetos y se colorearon con hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron en un microscopio Nikon ECLIPSE 50i (Tokio, Japón) asociado a una cámara Nikon DS-Fi2 (Tokio, Japón) con aumentos de 100  $\times$  y 200  $\times$ .

### III.7.6. Evaluación de parámetros bioquímicos séricos

#### Obtención del suero

Se extrajo sangre de los animales luego del sacrificio mediante punción cardíaca. Con el fin de obtener el suero, estas muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos para favorecer la reacción de coagulación y luego se centrifugaron a 3000 xg durante 10 minutos. Finalmente se recolectó el suero y se lo almacenó a -20°C (máximo una semana) para su posterior estudio.

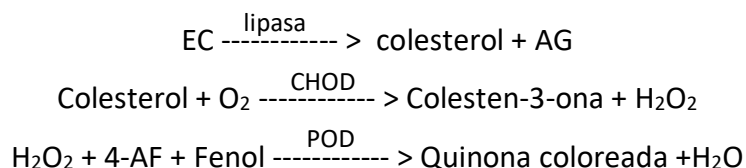
#### Colesterol

Con el fin de determinar la concentración de colesterol en las muestras de suero obtenidas se utilizó el kit comercial Colestat *enzimático* (Wiener lab. Rosario, Argentina).

Fundamentos del método: El kit contiene las enzimas lipasa fungal, colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD), las cuales reaccionan con los EC de la muestra y los demás reactivos del kit (4-aminofenazona (4-AF) y fenol) para dar un producto coloreado, según las siguientes reacciones:

## Materiales y Métodos

---



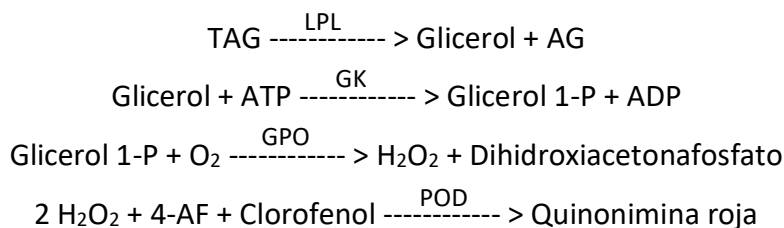
La DO del producto coloreado se midió en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a 505 nm, utilizandose el filtro correspondiente.

De esta manera, se pudo determinar la concentración de colesterol extrapolando los datos obtenidos a la curva de calibración realizada con el estándar que provee el kit.

### Triacilglicéridos

Con el fin de determinar la concentración de TAG en las muestras de suero obtenidas se utilizó el kit comercial TG Color *GPO/PAP AA* (Wiener lab. Rosario, Argentina).

Fundamentos del método: El kit contiene las enzimas lipoprotein lipasa (LPL), glicerol quinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa (POD), las cuales reaccionan con los TAG de la muestra y los demás reactivos del kit (ATP, 4-AF y clorofenol) para dar un producto coloreado, debido a las siguientes reacciones:



La DO del producto coloreado se midió en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a 505 nm, utilizandose el filtro correspondiente.

De esta manera, se pudo determinar la concentración de TAG extrapolando los datos obtenidos a la curva de calibración realizada con el estándar que provee el kit.

### Enzimas y proteínas plasmáticas

Las transaminasas o aminotransferasas son enzimas que se encuentran en mayor concentración en órganos tales como el hígado y/o el corazón. La alteración en la permeabilidad o destrucción de las membranas celulares pueden provocar la liberación de estas enzimas a la circulación sanguínea.

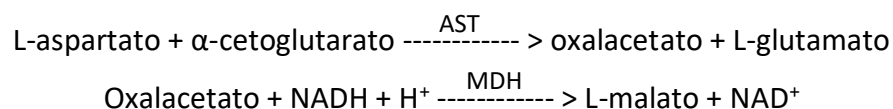
La albúmina es el principal contribuyente de las proteínas totales plasmáticas. Un aumento anormal en su concentración puede relacionarse casi siempre con eventos de deshidratación. Por otro lado, la hipoalbuminemia ocurre en condiciones patológicas tales como pérdida excesiva de proteínas en el síndrome nefrótico, desnutrición, infecciones prolongadas, enfermedad hepática o malabsorción.

Por estos motivos resulta clave estudiar estas proteínas, ya que sus niveles en plasma pueden dar indicios de la existencia de daños en ciertos órganos generados por el suministro del ACM.

### Aspartato aminotransferasa

Con el fin de determinar la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) en las muestras de suero obtenidas se utilizó el kit comercial GOT (AST) UV AA (Wiener lab. Rosario, Argentina).

Fundamentos del método: La AST cataliza específicamente la transferencia del grupo amino del aspartato para el  $\alpha$ -cetoglutarato, con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato se reduce a malato por la acción de la malato deshidrogenasa (MDH), en tanto que la coenzima NADH se oxida a  $\text{NAD}^+$ .



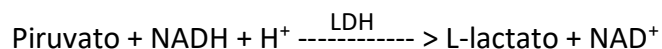
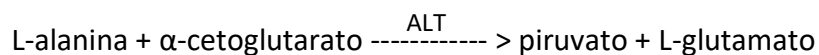
La reducción de la absorbancia a 340 nm, resultante de la oxidación del NADH, se monitoreó en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, siendo directamente proporcional a la actividad de la AST en la muestra.

De esta manera, se pudo determinar la actividad enzimática de AST extrapolando los datos obtenidos a la curva de calibración realizada con el estándar que provee el kit.

### Alanina aminotransferasa

Con el fin de determinar la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en las muestras de suero obtenidas se utilizó el kit comercial GPT (ALT) UV AA (Wiener lab. Rosario, Argentina).

Fundamentos del método: La ALT cataliza específicamente la transferencia del grupo amino de la alanina para el  $\alpha$ -cetoglutarato, con formación de glutamato y piruvato. El piruvato se reduce a lactato por la acción de la lactato deshidrogenasa (LDH), en tanto que la coenzima NADH se oxida a  $\text{NAD}^+$ .



La reducción de la absorbancia a 340 nm, resultante de la oxidación del NADH, se monitoreó en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, siendo directamente proporcional a la actividad de la ALT en la muestra.

De esta manera, se pudo determinar la actividad enzimática de ALT extrapolando los datos obtenidos a la curva de calibración realizada con el estándar que provee el kit.

### Albúmina

Con el fin de determinar el contenido de albúmina en las muestras de suero obtenidas se utilizó el kit comercial Albúmina AA (Wiener lab. Rosario, Argentina).

Fundamentos del método: En medio ácido y con adecuada fuerza iónica, la albúmina se une específicamente (sin separación previa) con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo-m-cresolsulfonftaleína (Verde de Bromocresol), originando un compuesto coloreado. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del Blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra. La absorbancia del producto coloreado se midió en un lector de placas Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a 625 nm, utilizandose el filtro correspondiente.

La concentración de albúmina se calculó extrapolando los datos obtenidos a la curva de calibración obtenida con el estándar del kit.

### **III.7.7. Medición de peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS**

#### Procesamiento de muestras de ratón

Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido (hígado y tumor) para realizar el homogenato. Para ello, se disgregó el tejido en PBS, en una relación 100 mg de tejido: 100 µl de PBS, con un homogeneizador Precytec, Industria Argentina, a potencia 3-4.

#### Ensayo de TBARS

En este caso el ensayo se realizó tal como lo describe el ítem III.4.7 del presente capítulo.

### III.7.8. Estudios de inmunohistoquímica: PCNA

La desregulación de la proliferación celular es una de las características del desarrollo tumoral. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue originalmente caracterizado como un polipéptido auxiliar esencial de ADN polimerasas y como un componente fundamental del replisoma eucariótico. Estudios posteriores demostraron que esta proteína interactúa con múltiples moléculas que se encuentran implicadas en diferentes vías metabólicas, incluyendo el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, reparación del ADN, síntesis translesional de ADN, metilación del ADN, remodelación de la cromatina y regulación del ciclo celular.

Para la inmunohistoquímica (IM) se utilizó la técnica de peroxidasa y el kit de detección LSAB2<sup>®</sup> System HRP (Dako) con revelado mediante diaminobencidina (DAB, Dako). El anticuerpo utilizado fue PCNA (clon PC10, M0879, Dako, dilución 1/50).

En los controles negativos se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. Como control positivo se utilizó un corte de linfonódulo (positividad en el centro germinativo de los nódulos secundarios).

Para la cuantificación de la IM de PCNA se utilizaron imágenes digitales obtenidas mediante una cámara digital Nikon DS-Fi2 (Tokyo, Japón) montada en un microscopio Nikon ECLIPSE 50i (Tokyo, Japón). Se seleccionaron las áreas de marcación más intensa y se obtuvieron microfotografías de alta resolución a 400 × de, al menos, 5 campos. Las imágenes se analizaron mediante el uso del software Image J 1.43e (National Institutes of Health, USA). Se contaron mínimamente 100 células positivas (con marcación parduzca nuclear o citosólica en células en mitosis) por campo y el porcentaje de células PCNA positivas se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células PCNA positivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$$

#### Técnica

Una vez obtenidos los cortes histológicos, éstos se desparafinaron mediante 2 pasajes por xilol, de 10 minutos cada uno. Luego, éstos se hidrataron mediante 2 pasajes por alcohol 100% (de 3 a 5 minutos cada uno), 2 pasajes por alcohol 96% (de 3 minutos cada uno), 1 pasaje por alcohol 80% (de 3 minutos) y 1 pasaje por alcohol 70% (de 3 minutos).

Se lavó con PBS durante 10 minutos. Se quitó su exceso y se incubó con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del kit (para inactivar la peroxidasa endógena) entre 4 y 6 minutos. Se lavó con PBS durante 10

minutos.

Posteriormente se procedió a la recuperación antigénica (calor húmedo a presión atmosférica (“vaporiera”)). Para ello se precalentó el buffer hasta que la temperatura alcanzó los 95-100 °C, se colocaron los portaobjetos en el buffer y se incubaron durante 20 a 40 minutos.

Luego, se retiraron los cortes del buffer y se secaron cuidadosamente, evitando su desecación.

Se bloquearon las uniones inespecíficas incubando con solución de leche descremada en PBS al 2.5% (p/v) durante 40 minutos. Se volcó el exceso de leche y se colocó el anticuerpo primario (excepto a los controles). Se incubó durante toda la noche a 4º C.

Se realizaron 3 lavados con PBS, de 5 minutos cada uno.

Se secó y se incubó con el anticuerpo puente del kit (inmunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-conejo y anti-ratón en PBS) durante 10 minutos. Se lavó con PBS durante 15 minutos.

Se secó y se incubó con la solución de estreptavidina-peroxidasa del kit durante 10 minutos. Se lavó con PBS durante 15 minutos.

Para el revelado, se incubó con solución de DAB del kit durante 2 minutos o hasta observar coloración parda en el corte. El revelado se interrumpió sumergiendo los cortes en PBS o agua corriente. Se sumergieron luego en agua destilada.

La coloración de contraste se realizó sumergiendo los cortes en hematoxilina de Gill durante aproximadamente 30 segundos. Se cubrió con agua corriente durante 10 minutos para que vire el colorante. Se lavó con agua destilada.

Se realizó un pasaje rápido por alcohol 96% y otro por alcohol 100%. Se escurrió e inmediatamente se sumergió en xilol. Finalmente se montó con bálsamo sintético.

### **III.8. Técnicas realizadas en ensayos *in vivo* e *in vitro***

#### **III.8.1. Ensayo de Western blot**

El Western blot es una técnica empleada para identificar la presencia de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, las cuales son separadas electroforéticamente.

##### **III.8.1.1. Procesamiento de muestras**

###### Procesamiento de muestras de cultivos celulares

Se sembraron 280000 células por placa de Petri 60 mm de diámetro, se realizaron los



respectivos tratamientos, y las células se lavaron dos veces con PBS. Se agregaron 100  $\mu$ L de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM (pH=8), NaCl 150 mM, NP-40 1% (v/v), Desoxicolato de Na 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v), EDTA 1 mM) con un cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Fisher Scientific) (1 gragea cada 10 ml) en frío. Las células se levantaron con *cell scraper* y se colectaron en tubos Eppendorf pre-enfriados. El contenido se incubó durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 13000 xg durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, se colectó el sobrenadante y se tomó una alícuota para medir proteínas por el método de Bradford. El resto se alicuotó a -70°C para futuros experimentos.

### Procesamiento de muestras de ratón

#### Obtención de homogenato de tumor

Se homogeneizaron mecánicamente 150 mg de tejido tumoral (previamente disgregado con tijera) con buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas. El homogenato obtenido se centrifugó a 12000 xg a 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C para su posterior análisis. Se determinó a partir de una alícuota la concentración de proteínas por el método de Bradford.

#### Separación de membrana plasmática tumoral

Se obtuvieron las fracciones correspondientes a la MP del tumor utilizando la técnica de Mander y colaboradores (1994) con algunas modificaciones (Mander et al. 1994). Se homogeneizaron mecánicamente 300 mg de tejido tumoral con el buffer de lisis (Sacarosa 0.25 M, HEPES 10 mM, EDTA 1mM, pH=7.4). El homogenato se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos. A su vez se preparó en un sistema de tubos y vasos comunicantes, un gradiente de Ficoll- Nicodenz, para lo cual se agregó una solución de Nicodenz 45% (p/v) y luego un gradiente de Ficoll 1-22% (p/v). El sobrenadante del homogenato se sembró por arriba del gradiente de Ficoll-Nicodenz y se centrifugó a 156200 xg a 4°C durante 19 horas. Se colectaron 20 fracciones del gradiente de 200  $\mu$ L cada una, a las cuales se les midió la concentración proteica por el método de Bradford. Se juntaron las alícuotas de MP, las cuales se identificaron debido a que producen un pico en la concentración proteica entre las fracciones 6 y 10 aproximadamente. Estos pools se emplearon para evidenciar la expresión de la proteína Ras presente sólo en MP.

### III.8.1.2. Electroforesis y transferencia

#### Preparación del gel y muestras. Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12,5% con dodecil sulfato de sodio (SDS) como agente desnaturizante. La corrida de los geles se llevó a cabo en una cuba de electroforesis Mini-Protean II (BIO RAD) con buffer de corrida (Tris-HCl 0.025 M (pH=8.3), Glicina 0.2 M, SDS 3.5 mM). Las muestras de tumor (homogenato total y/o MP (50 µg proteínas/calle)) o de células (40 µg proteínas/calle) se sembraron y corrieron a través del gel durante 30 minutos a 60 v y 1 hora 30 minutos a 110 v. Previamente a la siembra, las muestras fueron incubadas con buffer de carga 4X (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)) a 95°C durante 5 minutos. Luego de la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Hybond-P PVDF Membrane, Amersham Pharmacia Biotech), según la técnica descripta a continuación.

#### Transferencia “semi-seca” de proteínas

La membrana de PDVF se activó 1 minuto con metanol 100%. La membrana de PDVF, el gel y los papeles secantes se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 0.05 M, Glicina 0.04 M, Metanol 20% (v/v), SDS 0.04% (p/v)) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se armó el siguiente sistema (“sándwich”) en un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot SD (BIO RAD): se colocó un papel secante humedecido, sobre éste la membrana de PDVF, luego el gel y finalmente otro papel secante humedecido. La transferencia se llevó a cabo durante 45 minutos a 10 v. Luego de la misma, la membrana fue teñida con una solución del colorante Rojo Ponceau (Ponceau 0.5% (p/v) y ácido acético 1%(v/v)) durante 2 a 10 minutos para determinar si la transferencia fue correcta. Después de esta tinción, se procedió al lavado de la membrana con PBST (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; Tween-20 0.05 M; pH=7.4). Además, el gel se tiñó con Coomassie Blue para observar si la electroforesis y transferencia fueron exitosas. El exceso del colorante se eliminó con una solución decolorante de geles (agua: metanol: ácido acético (60:30:10)).

### III.8.1.3. Inmunomarcación y revelado

#### Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos

Se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana incubándola con leche descremada en PBST al 5% (p/v) a 4°C hasta el día siguiente. Luego, la membrana se lavó (tres veces por 10 minutos cada vez) con PBST y se procedió a su incubación con el anticuerpo primario específico para cada proteína (ciclinas, Ras y  $\beta$ -Actina), previamente diluido en leche descremada en PBST al 2% (p/v), el tiempo adecuado a 4°C (ver Tabla III.6). Posteriormente, se lavó la membrana nuevamente (tres veces por 10 minutos cada vez) y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) diluido en leche descremada en PBST al 2% (p/v), durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana con PBST (tres veces por 10 minutos cada vez).

Anticuerpo	Origen	Código	Dilución	Tiempo de incubación	Proveedor
Anti-panRas	Ratón	OP-4	1/200	2 horas	Calbiochem
Anti-ciclina D1	Ratón	sc-8396	1/200	ON	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ciclina E	Ratón	sc-377100	1/200	ON	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ciclina B	Ratón	sc-245	1/200	ON	Santa Cruz Biotechnology
Anti- $\beta$ -Actin	Ratón	AC-15	1/10.000	1 hora	Sigma-Aldrich
Anti-mouse (HRP)	Cabra	sc-2055	1/2.000	1 hora	Santa Cruz Biotechnology

Tabla III.6. Anticuerpos empleados en Western blot. Abreviatura. ON: overnight

#### Revelado

La actividad peroxidasa de las bandas inmunoreactivas se evidenció mediante quimioluminiscencia, incubando la membrana con luminol, cumárico y  $H_2O_2$  (enhanced chemiluminescence, ECL detection, Amersham Pharmacia Biotech), y exponiéndola a una placa autorradiográfica.

Como control de carga de las muestras de homogenato de tumor, MP y células se utilizó  $\beta$ -actina.

### III.8.2. Evaluación de apoptosis mediante el ensayo de TUNEL

El método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado ó técnica de TUNEL (marcado de final de corte de desoxinucleótidos tri-fosfato por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal) permite detectar apoptosis celular a partir de la fragmentación del ADN. La aparición de numerosos fragmentos de ADN con extremos 3'-OH libres (por acción de endonucleasas activadas durante la apoptosis) permite, a partir del enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), la unión de desoxinucleótidos tri-fosfato (dUTP) marcados con un fluorocromo (rodamina) a dichos extremos 3'-OH. De esta manera, es posible evaluar por microscopía de fluorescencia los núcleos de células apoptóticas presentes en preparados de corte de tejido o de cultivo celular.

#### III.8.2.1. Procesamiento de muestras

##### Procesamiento de muestras de cultivos celulares

Se sembraron 200000 células por pocillo sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos. Posteriormente a los tratamientos, las células se lavaron tres veces con PBS. Se agregó solución de fijación (paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora con leve agitación. Se enjuagó nuevamente con PBS, al menos tres veces, 10 minutos cada vez. Se adicionó solución permeabilizadora (Triton X-100 0.1% (v/v) y citrato de sodio 0.1% (p/v) en PBS) y se incubó durante 2 minutos a 4°C. Se enjuagó nuevamente con PBS (tres veces por 10 minutos cada vez).

##### Procesamiento de muestras de ratón

Los cortes de tejido se desparafinaron sumergiéndolos en xilol (3 cambios de 5 minutos cada uno), concentraciones crecientes de etanol: 100% (2 cambios de 5 minutos cada uno), 96% (1 cambio de 3 minutos) y 70% (1 cambio de 3 minutos), agua destilada (1 cambio de 5 minutos), y finalmente en PBS (1 cambio de 5 minutos). Una vez eliminado el líquido excedente de las muestras con papel adsorbente, se aplicó sobre las mismas proteinasa K (Invitrogen) en Tris-HCl 10 mM (pH=7.4-8) (20 µg/mL) durante 30 minutos a 37°C, con el fin de permeabilizarlas. Luego se realizaron dos lavados con agua destilada de 2 minutos cada uno.

### III.8.2.2. Ensayo de TUNEL

Para las muestras, se preparó el mix de reacción con el kit comercial para detección *in situ* de muerte celular (Roche): Solución de enzima y solución con dUTPs marcados. Se agregó una gota de dicho mix de reacción sobre cada cubreobjeto y se colocó parafilm sobre cada uno de ellos para evitar la evaporación. Se incubó 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

En paralelo, se realizaron los controles. Como control positivo de la reacción se trató una de las muestras con el kit de DNasa (Fermentas). El mix de reacción constó de: agua bidestilada estéril, buffer 10X con MgCl<sub>2</sub> y DNasa. Se incubó 20-30 minutos a 37°C en cámara húmeda. La reacción se cortó agregando una solución EDTA 0.5 M durante 2-5 min y se lavó con PBS. El control negativo constó de la incubación de una muestra con solución marcada solamente, sin enzima.

Todos los cubreobjetos se lavaron al menos 4 veces con PBS, se secaron parcialmente y montaron sobre portaobjetos con líquido de montaje conteniendo el colorante fluorescente diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen). Luego del secado de los preparados, éstos fueron sellados para evitar su resecación.

Las células TUNEL positivas se evidenciaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Tokio, Japón), asociado a una cámara digital Olympus DP70. Para realizar la cuantificación, se tomaron imágenes (aumento de 600 ×) de diez campos al azar de cada situación experimental (preparado), las cuales se analizaron con el software Image-ProPlus (IPPTM) v5.1 image analysis software (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD). El porcentaje de células apoptóticas se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos apoptóticos (TUNEL positivos)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos totales (teñidos con DAPI)}} \times 100$$

### III.9. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA (análisis de varianza) o test “t” (Student) según fuera pertinente, empleando el software GraphPad InStat (San Diego, CA, USA). Los gráficos se realizaron empleando el programa Sigma Plot Scientific Graphing Software (versión 10.0) de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). El análisis de imágenes se efectuó por medio del software “Image J” e “Image-ProPlus”, según correspondiera.

### **III.10. Bioética**

Los experimentos se realizaron según las directrices de manejo del Animal de Laboratorio de Wolfensohn y Lloyd (2013) (Wolfensohn and Lloyd 2008). Los protocolos de uso de los animales empleados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. Protocolo número: T09-02-2013.

# Capítulo IV

## Caracterización del aceite de cáscara de mandarina

### Rendimiento de extracción y densidad del ACM

Se evaluaron aspectos generales tales como el rendimiento de la extracción y la densidad del ACM, con el objetivo de programar y diseñar los ensayos del presente trabajo. El rendimiento de extracción del ACM fue del 0.32% (p/p), mientras que la densidad del ACM obtenida por gravimetría a 20 °C fue de  $0.829 \pm 0.004$  g/mL.

### IV.1. Componentes lipídicos no volátiles

#### Lípidos neutros

Los componentes lipídicos de ACM fueron separados mediante TLC tal como se describe en Materiales y Métodos. Se observó que el ACM, además de estar formado por Li, contiene trazas de TAG y de otro compuesto no identificado, que podría corresponderse con un compuesto también presente en el estándar comercial de Li (Figura IV.1).

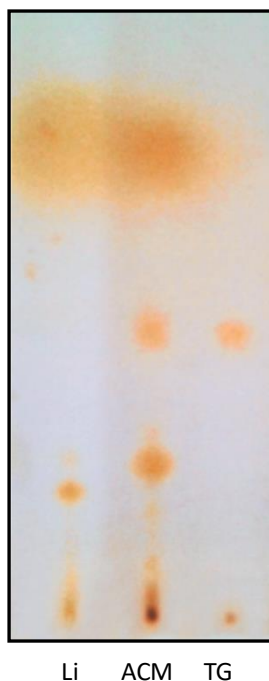


Figura IV.1. Lípidos Neutros. El aceite de cáscara de mandarina (ACM) y distintos estándares (Limoneno (Li) y Triacilglicéridos (TAG)) se separaron por TLC en una corrida de solvente 80:20:1 y se revelaron con iodo.



### Carotenoides

Además, se observó que entre los compuestos no volátiles, el ACM contiene al menos 4 grupos de carotenoides diferentes (Figura IV.2 A), entre ellos, algunos carotenoides libres y otros esterificados con AG (Figura IV.2 B). Según distintos trabajos, se han reportado altos niveles de  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno, violaxantina,  $\beta$ -Citaurina, entre otros (Agócs et al. 2007; Y.-C. Wang, Chuang, and Hsu 2008; Alquézar, Rodrigo, and Zacarías 2008) en diversos ACM. Los carotenoides evidenciados por TLC se identificaron estimativamente utilizando dos herramientas:

- Colores: Por asociación de los distintos grupos a las coloraciones que poseen los carotenoides  $\beta$ -citaurina (rojizo),  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -caroteno (anaranjado) y violaxantina (amarillo) según lo reportado en la bibliografía (Rodrigo et al. 2013).
- Estructuras: Según las polaridades de los carotenoides. En una corrida de TLC en la que se utilizó una fase móvil hexano: acetona (80:20), las xantofilas (polares) se encuentran más próximas al punto de siembra debido a que son más afines a la fase estacionaria, mientras que los carotenos (no polares), que son más afines a la fase móvil, se encuentran más próximos al frente de corrida, junto con los ésteres de carotenoides.

## Caracterización del aceite de cáscara de mandarina

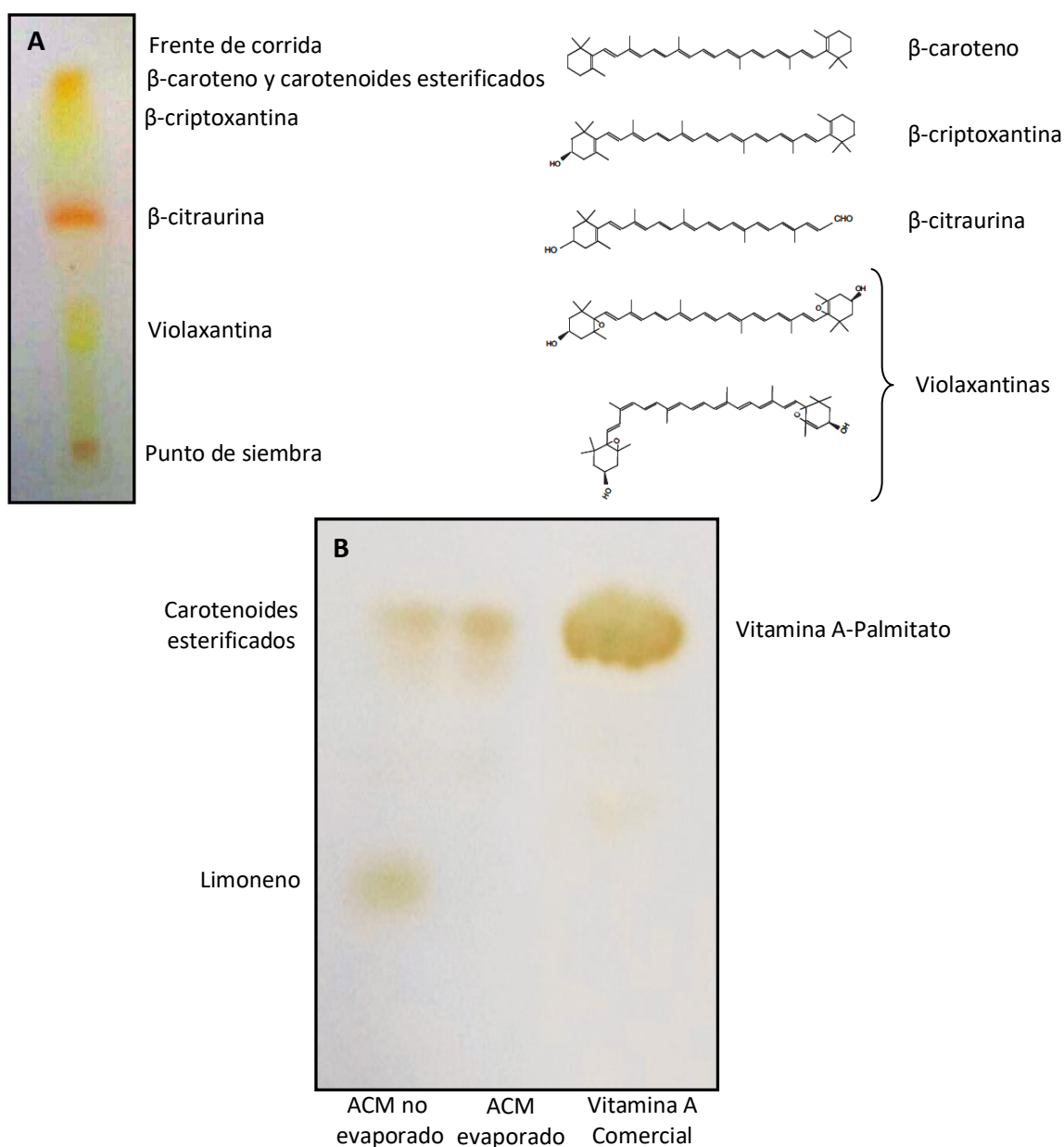


Figura IV.2. Carotenoides presentes en el aceite de cáscara de mandarina (ACM) separados por TLC empleando una corrida de solvente hexano: acetona (80:20). (A) Se observan distintos grupos de compuestos del ACM con coloraciones características de los carotenoides. (B) Se muestra la presencia de carotenoides esterificados del ACM en su estado original y luego de la eliminación del limoneno por evaporación al ser evidenciados con iodo.

A partir de las medidas espectrofotométricas de la curva de calibración obtenida utilizando una astaxantina comercial, se estimó que la concentración de carotenoides en el ACM es de 330  $\mu\text{g/mL}$  (Figura IV.3).

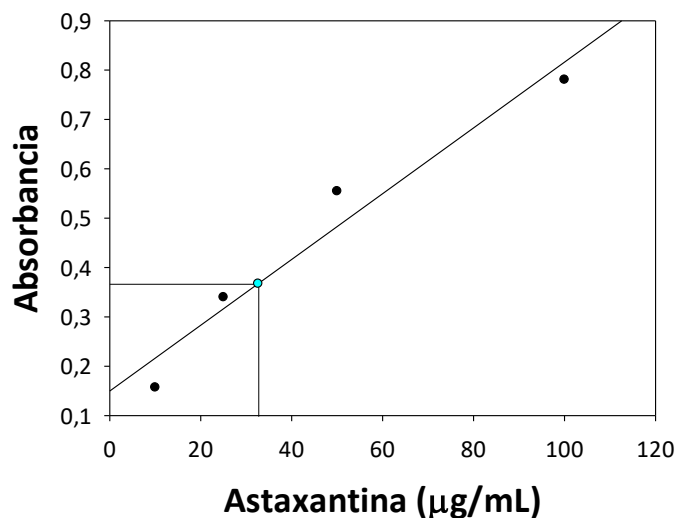


Figura IV.3. Curva de calibración de Absorbancia vs. Concentración de Astaxantina (µg/mL).

### Ácidos grasos

La composición de los AG se analizó utilizando GC y GC-MS. Los AG mayoritariamente detectados fueron el ácido palmítico (16:0) y el ácido linoleico (18:2 n-6), que representan más del 60% de los AG totales. El resto de los AG detectados son AG de longitudes similares, tanto saturados como insaturados (Figura IV.4; Tabla IV.1).

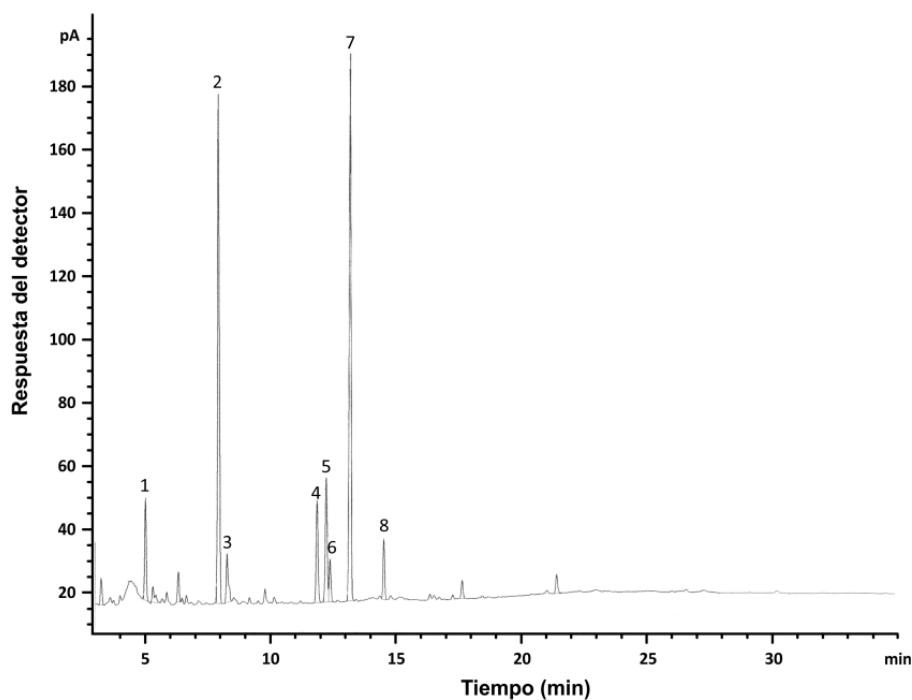


Figura IV.4. Perfiles cromatográficos de ácidos grasos presentes en el aceite de cáscara de mandarina (ACM) analizados por GC.

Pico	Ácido Graso	Composición porcentual
1	14:0	5.69
2	16:0	29.26
3	16:1 n7	3.51
4	18:0	6.61
5	18:1 n9	8.22
6	18:1 n7	2.58
7	18:2 n6	33.71
8	18:3 n3	3.49

Tabla IV.1. Composición porcentual de ácidos grasos del aceite de cáscara de mandarina (ACM) identificados por GC-MS y cuantificados por GC.

## IV.2. Componentes lipídicos volátiles

Una muestra del ACM obtenida fue analizada en el GC para evaluar su composición. Para lograr identificar los COV, la muestra del ACM fue obtenida por HS-SPME y se realizó el análisis por GC-MS. Los distintos isoprenoides fueron determinados a partir de una base de datos comercial.

Entre los COV, los hidrocarburos monoterpénicos son los principales componentes del ACM, y el Li fue el compuesto más abundante representando más del 94.6%, seguido de mirceno y  $\alpha$ -pineno. La presencia de todos los demás componentes ascendió en su conjunto al 3% aproximadamente (Figura IV.5; Tabla IV.2).

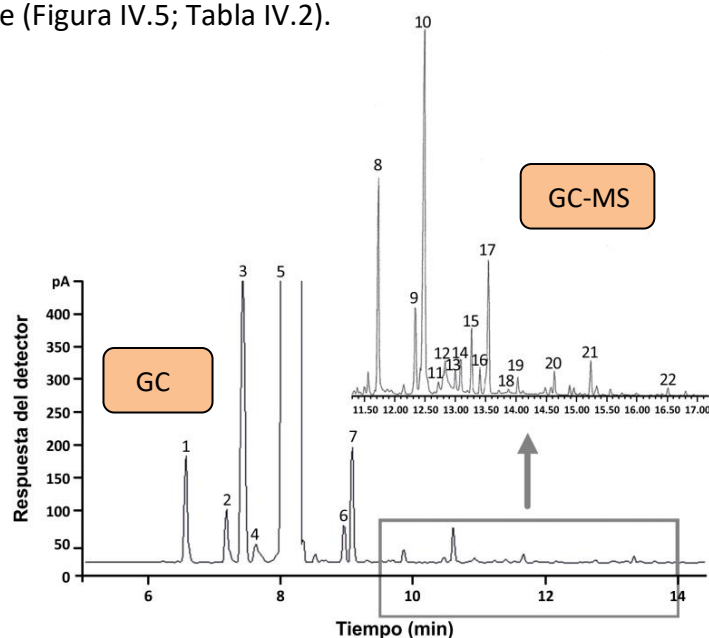


Figura IV.5. Perfiles cromatográficos de los compuestos orgánicos volátiles presentes en el aceite de cáscara de mandarina (ACM) analizados por GC y GC-MS.

Pico	COV	Composición porcentual	Índice de Kovats
1	$\alpha$ -pineno	0.55	939
2	$\beta$ -pineno	0.29	979
3	Mirceno	1.81	990
4	No determinado	0.15	-
5	Limoneno	94.59	1029
6	Terpinoleno	0.09	1088
7	Linalool	0.51	1096
8	Citronelal	2.01	1153
9	Terpineol- $\alpha$		1188
10	Decanal		1201
11	Citronelol		1225
12	Nerol		1229
13	Neral		1238
14	Carvona		1243
15	Decenal		1263
16	Geranial		1267
17	Aldehído de Perilla		1271
18	Undecanal		1306
19	Decadienal		1316
20	Acetato de Nerilo		1361
21	Dodecanal		1408
22	Farneseno		1505

Tabla IV.2. Composición porcentual de compuestos orgánicos volátiles presentes en el aceite de cáscara de mandarina (ACM) identificados por GC-MS y cuantificados por GC.

### IV.3. Discusión

Los principales componentes lipídicos del ACM son monoterpenos y carotenoides. Ambos grupos consisten en compuestos químicos naturales que son “generalmente reconocidos como seguros” para el uso en cualquier alimento (GRAS: Generally Recognized As Safe) (J. A. Miller et al. 2011; Ghatak and Sen 2016).

La mayoría de los estudios de caracterización química de los aceites de cáscara de *Citrus reticulata* se basan principalmente en el análisis composicional de sus COV, es decir de sus AE, por GC/GC-MS. Sin embargo, utilizando otras técnicas de detección como la cromatografía gaseosa con detección olfatométrica, algunos trabajos han identificado el olor de cada

componente del aceite y han podido así caracterizar su fragancia. De esta manera asocian al Li con un olor a menta o cítrico, al mirceno con naranja, al linalool con lavanda, etc (Chisholm, Jell, and Cass Jr 2003).

En el presente trabajo se determinó que la composición de los monoterpenos, principales componentes en el ACM de *Citrus reticulata* variedad Dancy, es similar al de otros cultivares reportados anteriormente (Ponkan o Clemetina), donde el Li es el constituyente más abundante y en donde también se hallaron trazas de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, terpinoleno y linalool. Otros compuestos como sabineno,  $\gamma$ -Terpineno, p-Cimeno, octanal, etc, fueron reportados en otros cultivares pero no fueron detectados en nuestras muestras (Sawamura et al. 2004; Buettner et al. 2003; Tirado et al. 1995).

Varios son los factores que pueden afectar a la variabilidad composicional de los aceites: cambios fisiológicos, condiciones ambientales, espacio geográfico, factores genéticos y evolutivos, tiempo de cosecha, métodos de extracción, forma de almacenamiento, etc. (Figueiredo et al. 2008).

Tirado y colaboradores (1995) demostraron una variación tanto cualitativa como cuantitativa de los componentes volátiles de aceites de distintos cítricos (limón, mandarina y naranja). Sin embargo, el análisis composicional de los aceites extraídos en distintas etapas de maduración de la mandarina, demostró que los componentes de la misma sólo cambiaron sus concentraciones en cada una de ellas. La cantidad de los componentes volátiles fue aumentando durante la maduración del fruto y éstos alcanzaron la máxima concentración en la etapa de maduración intermedia, la cual decreció a medida que las mandarinas maduraron completamente (Tirado et al. 1995). Debido a la gran variabilidad en la composición de los aceites, resultan relevantes los resultados obtenidos en este trabajo, donde se determinó la identidad y proporciones de los componentes de este ACM en particular, para aportar información a futuras interpretaciones y/o identificación del o los componentes que indujeron los mecanismos moleculares propuestos y que se desarrollan en los siguientes capítulos.

Los carotenoides de la mandarina *Citrus reticulata* se acumulan principalmente en la cáscara (hasta 94%) (Biacs and Daood 1994) donde se han reportado altos niveles de  $\beta$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y  $\beta$ -Citraurina, entre otros (Agócs et al. 2007; Y.-C. Wang, Chuang, and Hsu 2008; Alquézar, Rodrigo, and Zacarías 2008). Los carotenoides hidroxilados (xantofilas)

pueden estar presentes en forma libre o acilados con AG, formando ésteres como las criptoxantinas (Biacs and Daood 1994; Dugo et al. 2008), que son precursores de vitamina A (Burri 2015). En este trabajo se determinó la presencia de carotenoides libres y esterificados en el ACM. Se demostró la presencia de AG en el ACM, con mayor proporción de ácido palmítico y ácido linoleico. Estos resultados resultan novedosos ya que no se han hallado reportes bibliográficos que identifiquen la variedad de AG presentes en el aceite de la cáscara de *Citrus reticulata*, a diferencia de los AG presentes en los aceites de las semillas que se encuentran ampliamente reportados, y son muy similares a los encontrados en el ACM (Rashid et al. 2013; Ajewole and Adeyeye 1993). Nuestras observaciones sugieren que los AG del ACM son componentes de los carotenoides pero también de las trazas de TAG detectadas.

# Capítulo V

Efecto del aceite de  
cáscara de mandarina  
sobre el metabolismo  
lipídico



### V.1. Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en lípidos de células hepáticas HepG2 tratadas con ACM

Células HepG2 en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con distintas concentraciones de ACM o Li (su componente mayoritario) durante 48 horas. Las últimas 24 horas se incubaron en DMEM sin SFB y durante las últimas 3 horas se adicionó  $^{14}\text{C}$ -Acetato al medio de cultivo. Luego se extrajeron los lípidos totales, se separaron las distintas fracciones lipídicas y se cuantificó la radiactividad.

#### Concentraciones seleccionadas

Mediante ensayos de MTT se determinó que 100  $\mu\text{L/L}$  de ACM y 150  $\mu\text{L/L}$  de Li son concentraciones que inhiben la viabilidad celular significativamente en un 32% y un 28% respectivamente (Figura V.1). Por esta razón, para analizar los efectos del ACM sobre el metabolismo lipídico se seleccionaron concentraciones menores, que no inhibieran la viabilidad celular de manera significativa. Los ensayos se realizaron con concentraciones no mayores a 60  $\mu\text{L/L}$ .

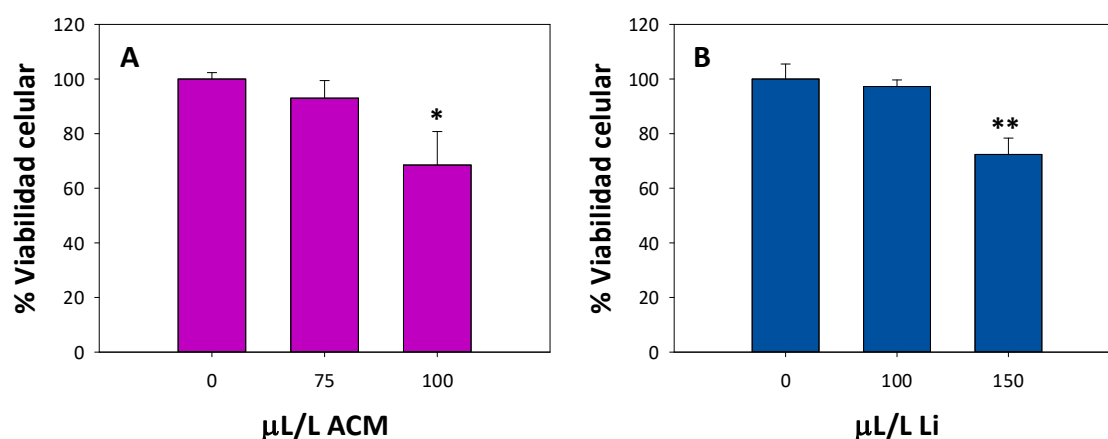


Figura V.1. Viabilidad celular en células HepG2 evaluada por el ensayo de MTT luego del tratamiento con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, n=12-16. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, respecto al control.

#### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en lípidos totales

El tratamiento de las células HepG2 con las concentraciones de ACM y Li evaluadas, produjo una disminución de la incorporación de acetato radiactivo en los lípidos totales estadísticamente significativa en las células tratadas con concentraciones a partir de 30  $\mu\text{L/L}$  del

## Efecto del aceite de cáscara de mandarina sobre el metabolismo lipídico

ACM y de 60  $\mu\text{L/L}$  para el Li, indicando un mayor efecto del aceite sobre su componente mayoritario (Figura V.2).

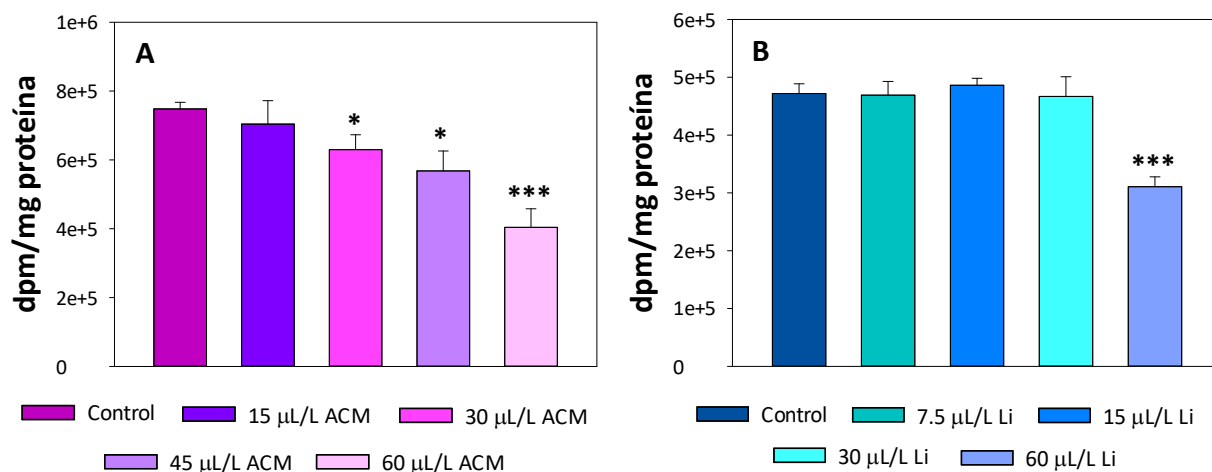


Figura V.2. Incorporación de marca radiactiva expresada en dpm/mg proteína en lípidos totales de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.

### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en lípidos saponificables

En una primera etapa se estudió cómo podría afectar el ACM la síntesis de AG en células hepáticas. Los AG son biomoléculas muy importantes ya que constituyen muchos otros lípidos, tales como TAG, FL y EC. Se observó que, si bien la incorporación de acetato en AG totales disminuyó en las células tratadas con las concentraciones más elevadas del ACM (45-60  $\mu\text{L/mL}$ ) (Figura V.3 A), los niveles de AG libres marcados no se modificaron significativamente (Figura V.3 B). A su vez, la relación de incorporación de acetato entre AG saturados e insaturados no varió de manera estadísticamente significativa (datos no mostrados).

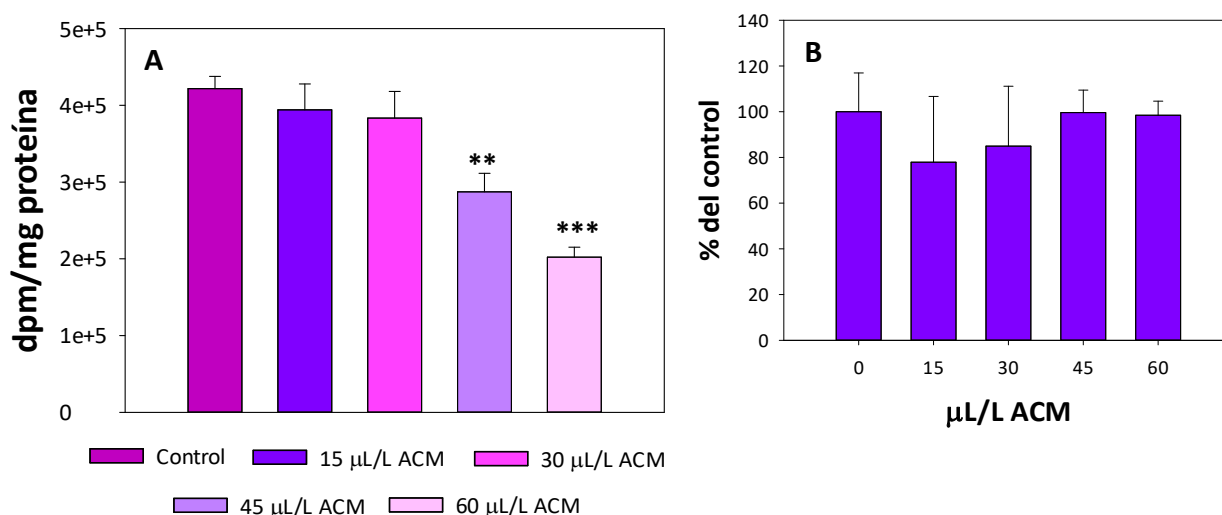


Figura V.3. Incorporación de marca radiactiva expresada en dpm/mg proteína en ácidos grasos totales (A) e Incorporación de marca radiactiva expresada como porcentaje (%) del control en ácidos grasos libres (B) de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 4-8). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. control.

Con el objetivo de interpretar la disminución en la incorporación de AG totales, no observada en AG libres, se evaluó la incorporación de acetato en otras especies lipídicas que contuvieran AG.

### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en glicerolípidos no polares

Posteriormente a la cuantificación de cada una de las especies separadas mediante TLC, se determinó una disminución significativa en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato en TAG y DAG a partir de 45  $\mu\text{L/L}$  de ACM (Figura V.5). En función de este hallazgo, se podría hipotetizar que la disminución en la cantidad de TAG podría deberse al déficit de uno de los sustratos necesarios para su biosíntesis (DAG) en células hepáticas.

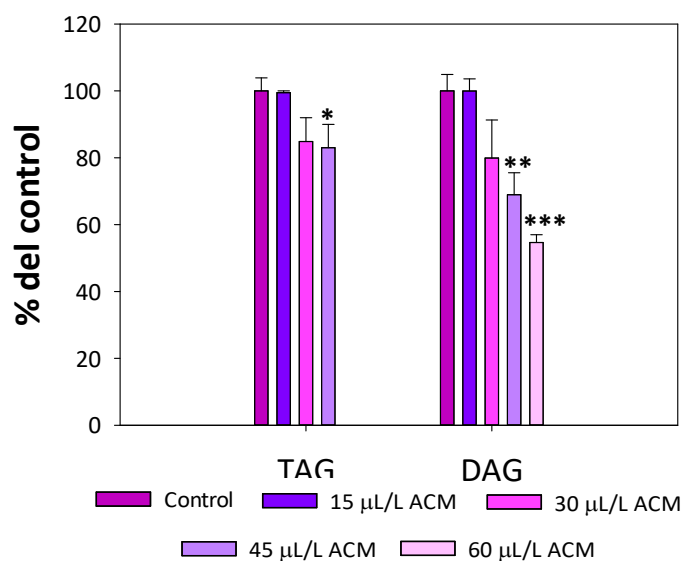


Figura V.5. Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato expresada como porcentaje (%) del control en TAG (triacilglicéridos) y DAG (diacilglicéridos) de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 4-8). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. control.

### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en glicerolípidos polares

Los FL en general mostraron una tendencia a disminuir la incorporación con los tratamientos con el ACM, aunque sólo la FS lo hizo de manera significativa con las concentraciones más altas ensayadas (Figura V.6).

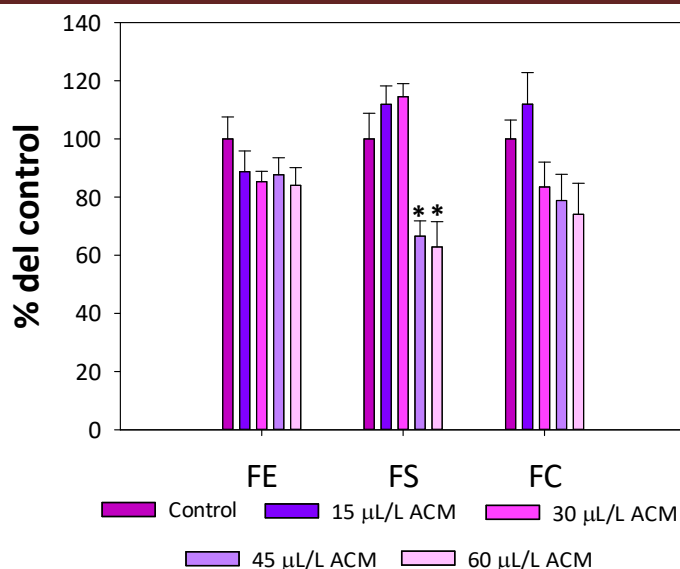


Figura V.6. Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato expresada como porcentaje (%) del control en fosfolípidos (FE: Fosfatidiletanolamina; FS: Fosfatidilserina; FC: Fosfatidilcolina) de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 4-8). \*p<0.05 vs. control.

### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en ésteres de colesterol

Se observó una disminución en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato en EC (componente importante de lípidos de reserva). La disminución fue estadísticamente significativa en células tratadas con concentraciones superiores a 30 µL/L de ACM (Figura V.7).

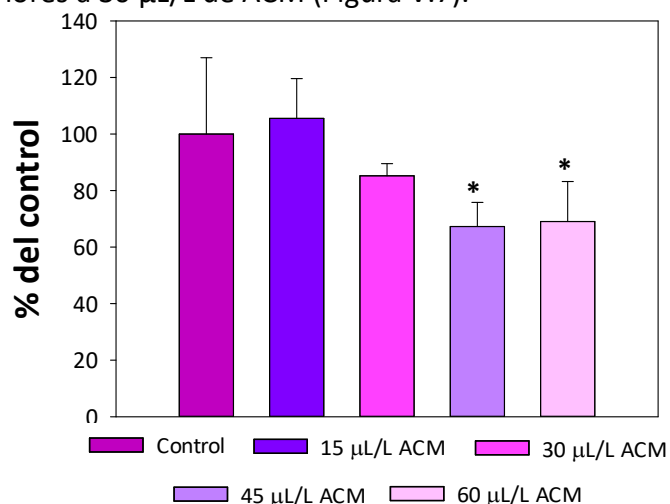


Figura V.7. Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato expresada como porcentaje (%) del control en ésteres de colesterol (EC) de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 4-8). \*p<0.05 vs. control.

### Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Acetato en lípidos insaponificables

Se estudió la incorporación de marca radiactiva en los lípidos insaponificables, que incluyen tanto intermediarios como productos de la VM (lanosterol, escualeno, colesterol, ubiquinona). Luego de los tratamientos con ACM, se observó un descenso significativo de la incorporación de marca radiactiva en los lípidos insaponificables a partir de 60  $\mu\text{L/L}$ , tanto para el ACM como para Li (Figura V.8).

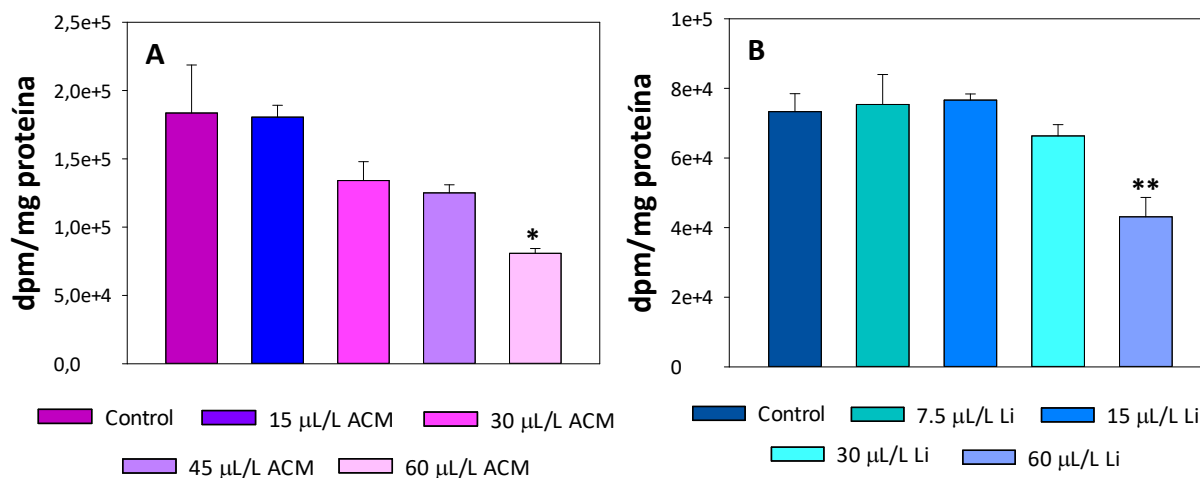


Figura V.8. Incorporación de marca radiactiva expresada en dpm/mg proteína en lípidos insaponificables de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control.

El análisis de los lípidos insaponificables mostró que el tratamiento con el ACM ocasionó una inhibición de la colesterogénesis dosis dependiente con una reducción de la síntesis del colesterol (producto final mayoritario de la VM) que resultó significativa en células tratadas con concentraciones a partir de 45  $\mu\text{L/L}$  de ACM (Figura V.10 A), arrojando un valor de IC50 de síntesis de colesterol (IC50sc) de 54  $\mu\text{L/L}$  (Figura V.9 A). Este valor es aproximadamente la mitad de su IC50 de inhibición de la viabilidad celular.

En el caso del Li, también se determinó una inhibición en la síntesis de colesterol, sólo que ésta se hizo significativa a partir de 30  $\mu\text{L/L}$  (Figura V.10 B); a su vez, se calculó un valor de IC50sc de 48  $\mu\text{L/L}$  (Figura V.9 B), aproximadamente la cuarta parte de su IC50 de viabilidad celular.

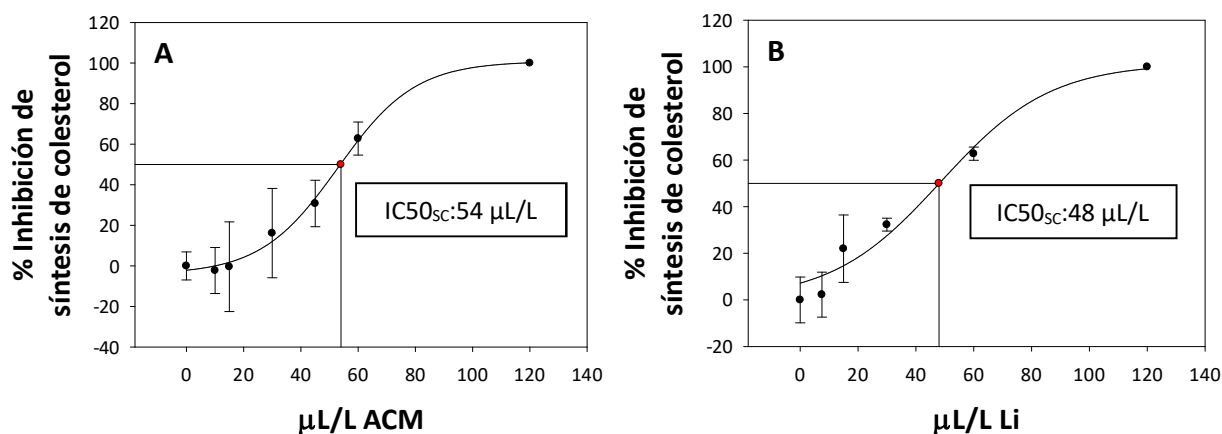


Figura V.9. Curvas de inhibición de síntesis de colesterol vs. concentración de aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B), y sus respectivos valores de  $IC_{50sc}$  de síntesis de colesterol ( $IC_{50sc}$ ).

Al evaluar la incorporación de  $^{14}C$ -Acetato en intermediarios de la VM específicamente involucrados en la colesterogénesis, como son el lanosterol y el escualeno, se observó que las células tratadas con bajas concentraciones del ACM (15  $\mu L/L$ ), muestran un incremento en la incorporación de radiactividad en ambos compuestos con respecto a sus respectivos controles (no estadísticamente significativo probablemente debido a un número insuficiente de muestras analizadas). Sin embargo, las células tratadas con altas concentraciones de ACM (60  $\mu L/L$ ) muestran una clara disminución dosis-dependiente de la incorporación de acetato en ambos intermediarios. La ubiquinona, en cambio, otro producto final de la VM, registró un incremento significativo de la radiactividad incorporada particularmente en células tratadas con concentraciones del ACM menores a 60  $\mu L/L$  (Figura V.10 A).

Por otra parte, al estudiar los intermediarios de la VM en células HepG2 tratadas con bajas concentraciones de Li, se observó principalmente una marcada incorporación de marca radiactiva en escualeno, mientras que en lanosterol la incorporación no aumentó de manera significativa. Ambos compuestos comienzan a mostrar una reducción de la radiactividad incorporada a partir de 30  $\mu L/L$ . La ubiquinona aumenta sus niveles de incorporación a las mismas concentraciones en las cuales se registra el incremento de radiactividad en escualeno (Figura V.10 B).

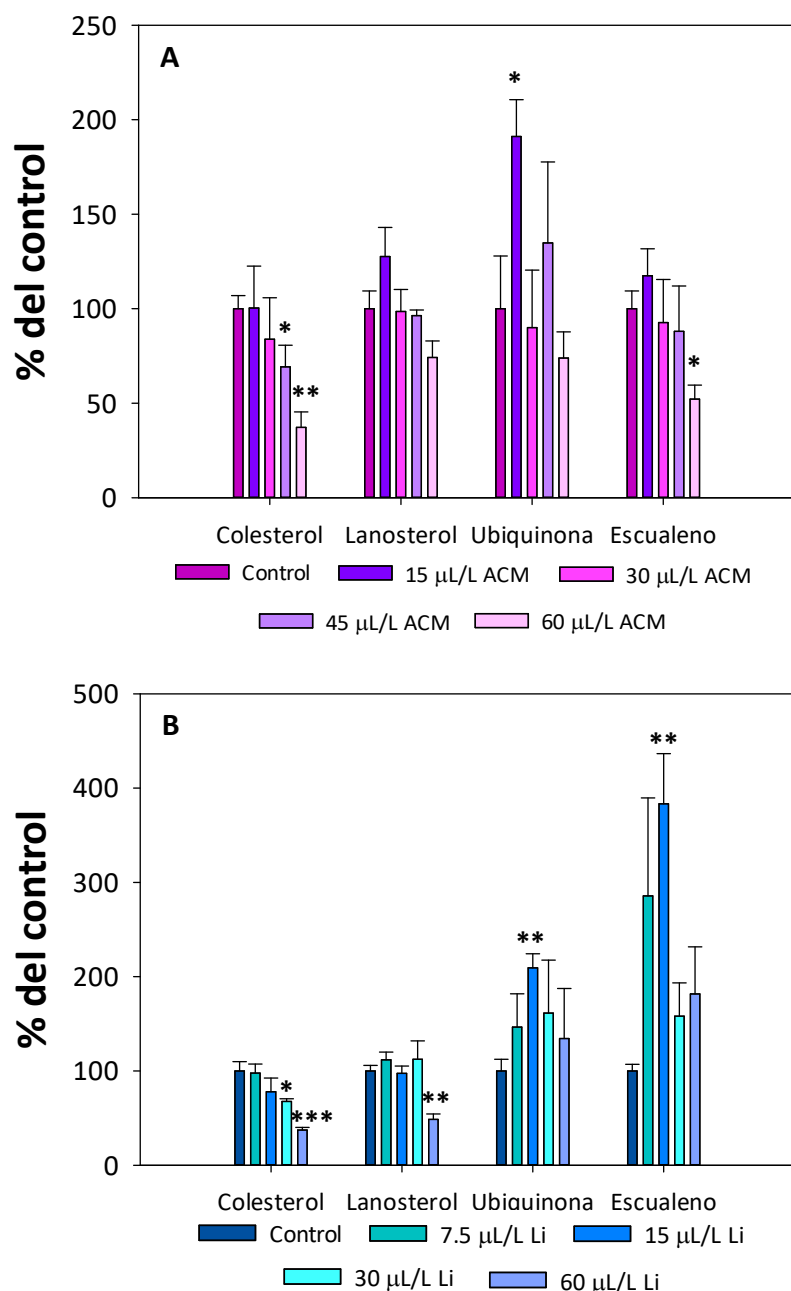


Figura V.10. Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato expresada en dpm/mg proteína en colesterol, lanosterol, ubiquinona y escualeno de células HepG2 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B). Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



### V.2. Efecto del ACM sobre el depósito lipídico en la línea celular de macrófagos Raw 264.7

El contenido del depósito de lípidos neutros (gotas lipídicas) se evaluó en las células espumosas (diferenciadas de macrófagos Raw 264.7) tratadas con ACM. La diferenciación de los macrófagos se realizó por activación de los mismos con LDLox.

Previamente se verificó la oxidación de las LDL obtenidas con una concentración de  $0.9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  a partir de plasma humano, mediante el ensayo de TBARS, utilizando como control LDL nativas (LDL sin oxidar).

Tal como se muestra en la Figura V.11, el nivel de oxidación de los lípidos de las LDLox fue aproximadamente un 17 % mayor que el que poseían las LDL nativas.

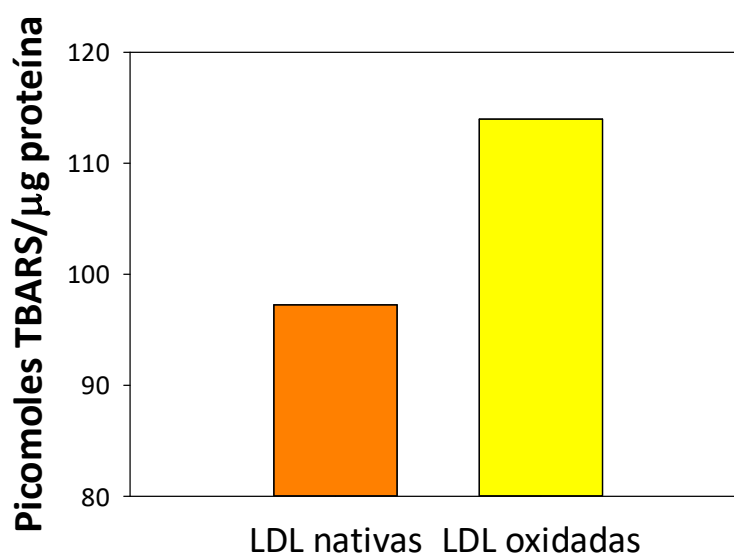


Figura V.11. Niveles de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) nativas y oxidadas evaluados por el ensayo de TBARS luego de su obtención.

#### Diferenciación de macrófagos a células espumosas con LDLox

La transformación macrófago-célula espumosa se evidenció por la aparición de una gran cantidad de gotas de lípido en el interior celular, que se tiñen de color rojo oscuro-marrón al ser coloreadas con Oil Red O (Figura V.12).

A partir de las 8 horas de incubación de los macrófagos con una concentración de  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  de LDLox, se observó la aparición de gotas lipídicas (Figura V.12 B) que fueron aún más grandes y numerosas luego de 24 horas de incubación con LDLox (Figura V.12 D), evidenciando una clara diferenciación a célula espumosa.

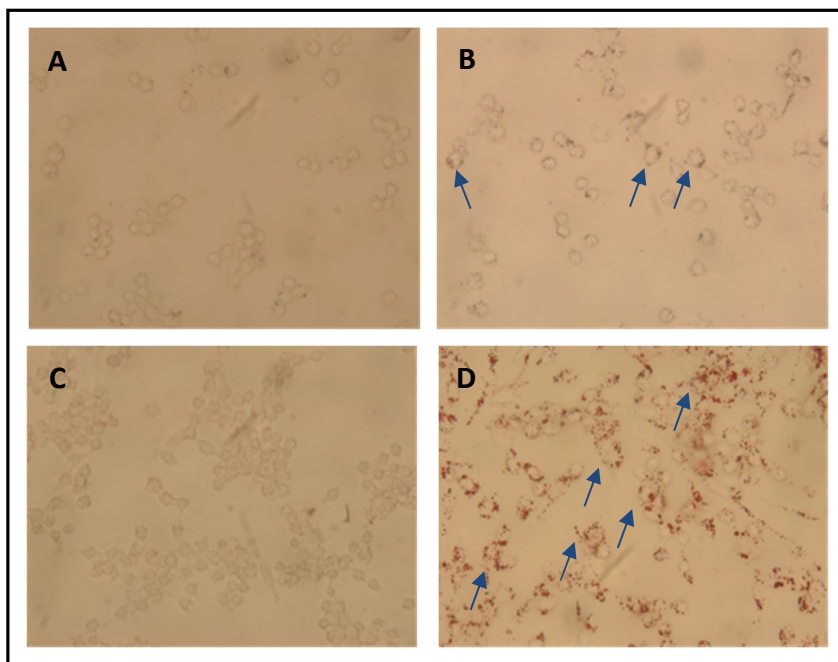


Figura V.12. Fotografías obtenidas por microscopía óptica de macrófagos Raw 264.7 y células espumosas fijadas con paraformaldehído 4% y teñidas con Oil Red O (aumento 600 ×). Los macrófagos fueron incubados durante 8 horas en medio de cultivo en ausencia (A) o presencia de LDL oxidadas (LDLox) (50 µg/mL) (B), o bien durante 24 horas en medio de cultivo en ausencia (C) o presencia de LDLox (50 µg/mL) (D). Las gotas lipídicas teñidas con el colorante se observan de color rojo oscuro-marrón y son señaladas con flechas azules.

### Efecto del ACM sobre la viabilidad celular en macrófagos y en células espumosas

Los macrófagos fueron incubados 24 horas en medio de cultivo con SFB para inducir la proliferación celular y luego fueron tratados con distintas concentraciones de ACM y Li durante 24 horas en medio sin SFB para evaluar el efecto de los mismos sobre la viabilidad celular. Mediante el ensayo de MTT y el análisis por regresión no lineal utilizando el programa Sigma Plot 10.0 de las curvas dosis-respuesta obtenidas, se determinó la concentración de ACM y Li en la cual se inhibe en un 50 % la viabilidad celular (IC<sub>50</sub>) resultando valores de 47 µL/L y 50 µL/L respectivamente.

A partir de estos resultados se seleccionaron concentraciones no mayores a 65 µL/L para el diseño de distintas condiciones experimentales (tiempos de tratamiento, presencia o ausencia de SFB en el medio de cultivo, etc) que se implementaron en macrófagos y en células espumosas.

En un primer ensayo se evaluó el efecto del ACM y el Li sobre la viabilidad de células previa

activación con LDLox. Este diseño permite comenzar el tratamiento sobre los macrófagos pero continúa durante su proceso de diferenciación a células espumosas. Los resultados de este ensayo mostraron niveles altos de inhibición de la viabilidad, principalmente en las células tratadas con Li siendo aún mayores en los casos en que las células fueron incubadas en medio de cultivo sin SFB (Figura V.13 A).

Un segundo ensayo fue diseñado para evaluar el efecto del ACM y el Li sobre las células espumosas ya diferenciadas, por lo que los macrófagos fueron incubados durante 8 horas con LDLox y luego fueron tratados con el ACM o el Li (Figura V.13 B). Asimismo se realizó un tercer ensayo donde el ACM fue incorporado al medio de cultivo de macrófagos de manera simultánea al agregado de LDLox (co-incubación de macrófagos con ACM y LDLox) (Figura V.13 C). Los resultados de estos dos últimos ensayos mostraron los menores porcentajes de inhibición de la viabilidad (del orden del 10-15%), evidenciando que tanto el ACM como el Li no poseen efectos citotóxicos sobre las células espumosas.

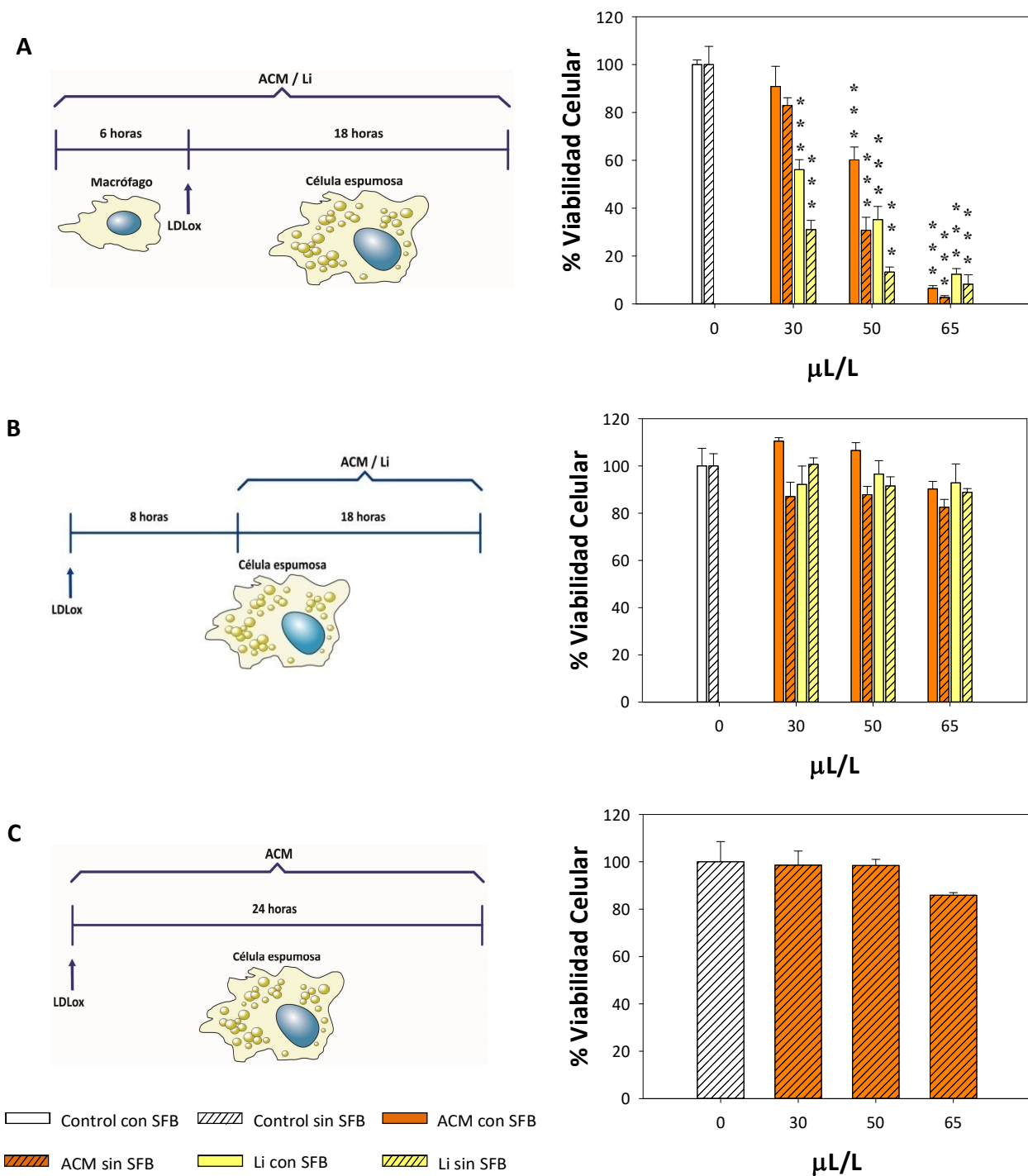


Figura V.13. Viabilidad celular en macrófagos y células espumosas en diferentes condiciones experimentales evaluada por el ensayo de MTT. A: Preincubación con aceite de cáscara de mandarina (ACM)/limoneno (Li) (6 horas) y posterior tratamiento con ACM/Li y LDL oxidadas (LDLox) (18 horas, con y sin SFB). B: Preincubación con LDLox (8 horas) y posterior tratamiento con ACM/Li (18 horas, con y sin SFB). C: Coincubación de ACM y LDLox sin SFB de 24 horas. Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 4). \*\*\*p < 0.001 vs. control.

### Efecto del ACM sobre el contenido lipídico celular

Se evaluó espectrofotométricamente el contenido de lípidos neutros (componentes mayoritarios de las gotas lipídicas) teñidos con el colorante Oil Red O en las células espumosas tratadas con concentraciones de ACM y Li que demostraron no inhibir significativamente la viabilidad celular.

En función de los resultados obtenidos en la cuantificación de la absorbancia dada por el colorante incorporado en las gotas lipídicas y que se muestran en la Figura V.14, se observó que en el tratamiento de las células espumosas con ACM, los depósitos lipídicos disminuyeron con respecto al lote control de manera significativa ( $p < 0.01$ ), mientras que en el tratamiento con Li no hubo variaciones estadísticamente significativas. Estos resultados indicarían que el contenido lipídico en células espumosas estaría disminuyendo por efecto de algún/os componentes del ACM, distintos del Li.

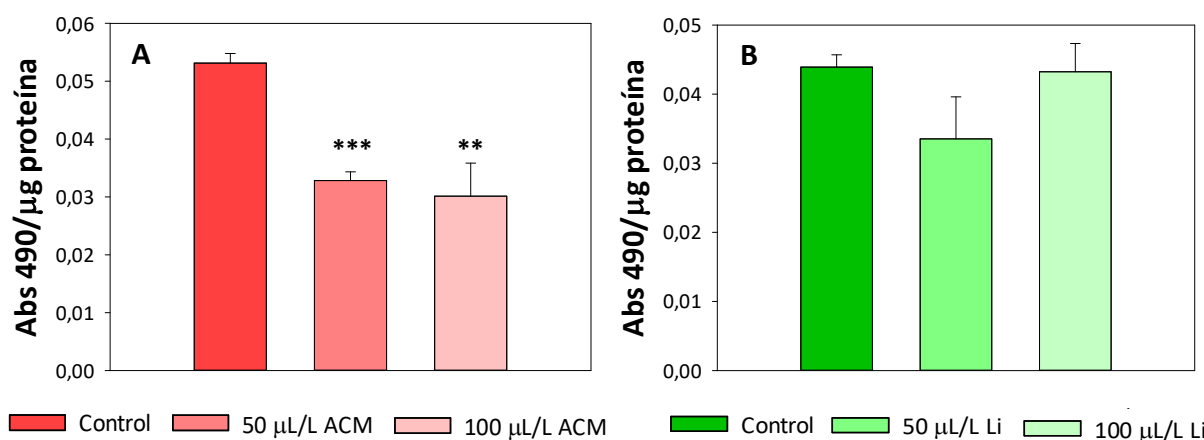


Figura V.14. Contenido de gotas lipídicas presentes en células espumosas luego de la incubación con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) o limoneno (Li) (B). Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y teñidas con Oil Red O, y se cuantificó el contenido de las gotas lipídicas mediante la extracción con isopropanol del colorante incorporado en las mismas. Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.

### **V.3. Efecto del ACM sobre la expresión génica de CD36, GPAT y CPT1 en células espumosas**

#### Chequeo de ARNm obtenido y amplificación del ADNc

Como primer paso se extrajo el ARNm total de los cultivos macrófagos diferenciados a células espumosas, del cual posteriormente se obtuvo por retrotranscripción el ADNc. Se verificó tanto la calidad del ARN obtenido y la ausencia de ADN contaminante, así como la eficacia del sistema

de amplificación de los genes CD36, GPAT3, CPT1 y  $\beta$ -actina mediante una PCR cualitativa (Figura V.15).

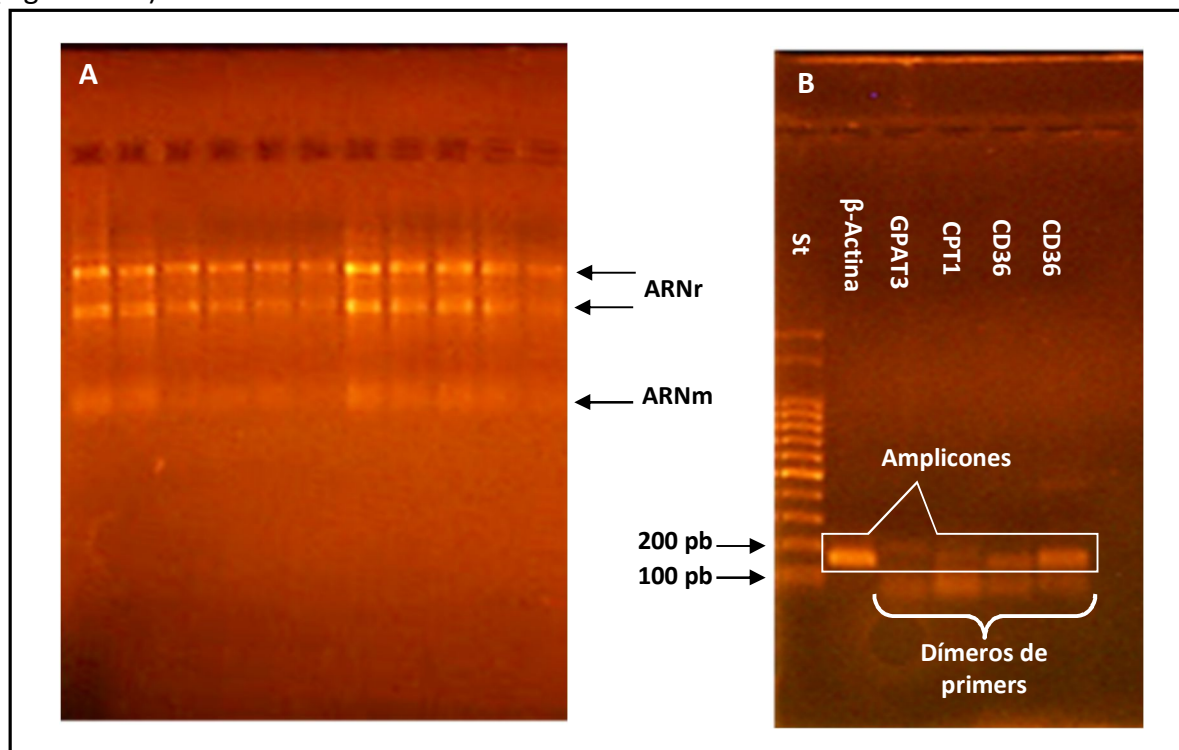


Figura V.15. Chequeo de la calidad del ARN y de amplificación de ADNc. El ARN extraído de los cultivos celulares fue sembrado en un gel de agarosa 1% para corroborar la integridad del mismo (A). Los amplicones generados por PCR semi-cuantitativa a partir del ADNc incubado con los primers diseñados para amplificar los genes de CD36, GPAT3, CPT1 y  $\beta$ -actina fueron sembrados en un gel de agarosa al 2% con un estándar de peso molecular (St) (B).

### Expresión de CD36, GPAT3 y CPT1

Células RAW 264.7 fueron diferenciadas a células espumosas mediante la incubación con LDLox (50  $\mu$ g/mL) durante 8 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con dos concentraciones de ACM y Li (50 y 100  $\mu$ L/L) durante 18 horas.

Estos genes fueron seleccionados para medir su expresión debido a que están asociados tanto a la diferenciación del macrófago a célula espumosa (CD36) así como al metabolismo lipídico (CD36, GPAT3 y CPT1).

El análisis por qPCR de los genes CD36, GPAT3 y CPT1 arrojó resultados que podrían explicar cómo estarían actuando el ACM y el Li. Los niveles de expresión de cada gen según el

tratamiento efectuado pueden observarse en la Figura V.16.

- Se observó una tendencia a la disminución de la expresión de CD36 en los tratamientos de las células espumosas con Li y ACM. Al disminuir la expresión de este gen, podría sugerirse una menor incorporación de LDLox en células espumosas.
- La expresión de GPAT3 disminuyó significativamente con el tratamiento de 100  $\mu$ L/L de ACM, lo cual contribuiría a la reducción del contenido lipídico en estas células. No se evidenciaron cambios en el caso de los tratamientos con Li.
- Se evidenció una tendencia al aumento en la expresión de CPT1 con el tratamiento de 100  $\mu$ L/L de ACM, lo cual podría relacionarse con la disminución del depósito lipídico. Sin embargo, el tratamiento con el Li mostró una tendencia a la disminución en la expresión de CPT1, lo cual estaría correlacionando con una conservación del contenido lipídico.

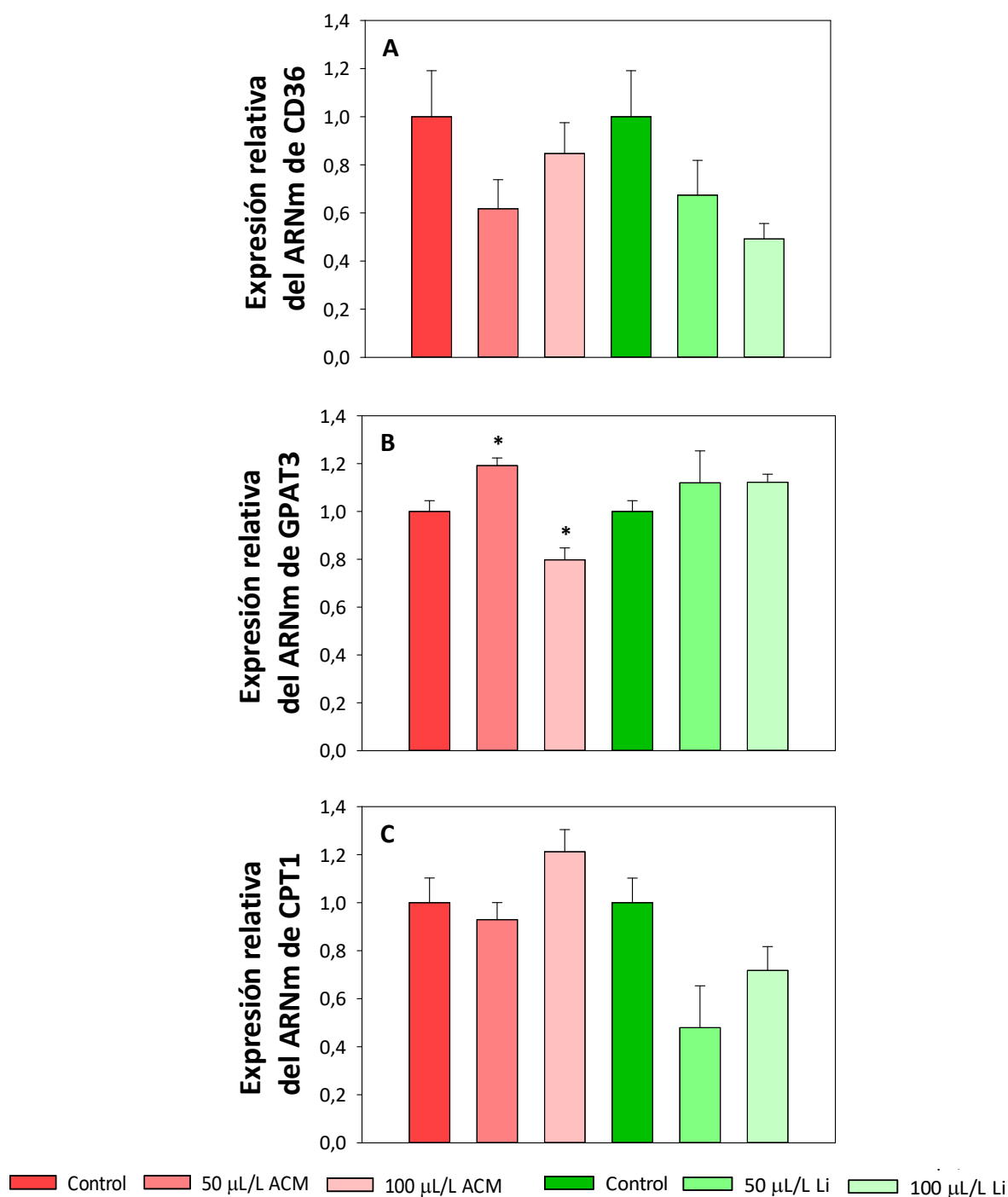


Figura V.16. Niveles de ARNm de CD36, GPAT3 y CPT1 en células espumosas derivadas de macrófagos RAW 264.7 tratadas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) y limoneno (Li). Se obtuvo el ARNm de los cultivos tratados con 50 o 100  $\mu\text{L/L}$  de ACM o Li y controles, y se determinó por RT-PCR en tiempo real la cantidad relativa del ARNm de CD36 (A), GPAT3 (B) y CPT1 (C). Los resultados fueron normalizados con  $\beta$ -actina como gen constitutivo y se expresan como la media  $\pm$  SEM,  $n=3$ ; (\*)  $p < 0.05$  respecto al control.



### V.4. Discusión

El depósito e infiltración de lípidos en las paredes de las arterias produce una reacción inflamatoria que genera engrosamiento de las mismas (placa de ateroma) con el consecuente estrechamiento de la luz arterial y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterosclerosis. La hipercolesterolemia, el estrés oxidativo inducido por el aumento de radicales libres plasmáticos y el incremento de depósitos lipídicos en células espumosas, son factores de riesgo estrechamente asociados al desarrollo y progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, la disminución de los niveles de colesterol plasmático es una de las estrategias farmacológicas más utilizadas para el tratamiento y prevención de dicha patología. Si bien la homeostasis del colesterol depende de la interacción entre distintos tipos celulares, principalmente hepatocitos, macrófagos y enterocitos, e incluye distintos mecanismos moleculares, las células del hígado cumplen un rol fundamental en la regulación de los niveles de lípidos plasmáticos mediante la síntesis *de novo*, en particular del colesterol.

En la actualidad, las estatinas son los fármacos hipocolesterolemiantes más utilizados, cuyo blanco terapéutico es la VM. Estos compuestos inhiben competitivamente la HMGCR, enzima principalmente activa en las células hepáticas, que actúa en las primeras etapas de la vía inhibiendo no sólo la síntesis de colesterol sino también la de otros productos y/o compuestos intermediarios de la misma que cumplen roles fundamentales en procesos fisiológicos como la viabilidad y proliferación celular. Por otro lado, las dosis estándar de estatinas reducen los niveles plasmáticos de las LDL y TAG, aunque la disminución de estos últimos lo realizan de una manera menos eficaz.

La inhibición de la HMGCR afecta la síntesis de todos los compuestos que se encuentran río abajo del HMG-CoA, en particular el FPP que se encuentra en la ramificación de la vía y es el precursor de una serie de compuestos isoprenoides no esteroideos que se sintetizan en reacciones pre-escualeno, como son ubiquinona, dolicol, hemo A, grupos prenilos, ARNt, etc (Mark et al. 1996). Dichos compuestos son responsables de diversas funciones importantes para la célula como síntesis de ATP, glicosilación y prenilación de proteínas, transcripción de ARN, etc, y su déficit podría ocasionar ciertos efectos colaterales. Los pacientes medicados con estatinas pueden tolerar dosis estándar, pero las altas dosis pueden asociarse con efectos adversos, como un aumento de las enzimas hepáticas y rabdomiolisis, una enfermedad

muscular debida en parte a la reducción de los intermediarios isoprenoides de la síntesis del colesterol y sus metabolitos, por ejemplo, la coenzima Q 10 (Pedersen and Tobert 1996).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el ACM inhibe la síntesis de colesterol. Sin embargo, a diferencia de las estatinas, se estarían inhibiendo otras enzimas río abajo de la HMGCR.

Como se representa en la Figura V.17 se observó que bajas concentraciones del ACM ( $<60 \mu\text{L/L}$ ), en los hepatocitos, disminuyen la síntesis de colesterol pero aumentan la incorporación de acetato en los intermediarios de la VM escualeno y lanosterol. El Li, por su parte, también disminuyó los niveles de colesterol pero incrementó mayormente los niveles de escualeno. Estos resultados permiten predecir una inhibición en alguna/s enzima/s de la conversión de escualeno a lanosterol y también en enzima/s interviniente/s en la transformación de lanosterol a colesterol. Entre estas enzimas se encuentra la OSC, que normalmente cataliza la reacción de ciclación del MOS para formar lanosterol, un paso clave en la vía de síntesis de colesterol que genera el primer compuesto tetracíclico, del cual derivan todos los esteroides. Cuando la OSC se encuentra inhibida parcialmente, se produce una derivación (shunt) de la vía hacia la síntesis de 24,25-epoxicolesterol, la cual prevalece por sobre la de colesterol (Rowe et al. 2003). El 24,25-epoxicolesterol, además de ser represor de la HMGCR es un agonista natural del receptor nuclear LXR (Janowski et al. 1999).

Los resultados obtenidos sugieren que a estas concentraciones, el ACM estaría inhibiendo principalmente enzimas que se encuentran río abajo del FPP, como la enzima OSC, interviniendo en una reacción post-escualeno, en donde se produce inhibición en la síntesis de colesterol sin afectar la síntesis de moléculas isoprenoides no esteroideas de gran importancia biológica. Por este motivo, la inhibición de la OSC representa un blanco terapéutico muy prometedor como agente hipocolesterolemia.

Por otro lado, a partir de nuestros resultados proponemos un mecanismo dual del ACM (o alguno/s de sus componentes) sobre la expresión de genes blanco de LXR, activándolos o inhibiéndolos de una manera tejido específica, acorde a lo que se reportó para otros monoterpenos (Jun et al. 2013; Hoang et al. 2012).

Jun y colaboradores (2013) demostraron que el monoterpeno cineole, en hepatocitos reguló negativamente la expresión de LXR, por lo cual genes blanco de dicho receptor relacionados con

la lipogénesis no fueron activados. Por el contrario, en macrófagos, se indujo un aumento en la expresión a nivel transcripcional de LXR y en consecuencia se activaron ciertos genes, entre ellos los que codifican para proteínas que regulan el transporte reverso de colesterol como son los transportadores ABC (Jun et al. 2013).

Basados en estos reportes y en nuestros resultados, se hipotetiza que en hepatocitos tratados con el ACM la expresión de LXR estaría disminuida por lo que no se activarían genes relacionados a la síntesis de AG (ACC, FAS, etc) y TAG (GPAT3), y consecuentemente se produciría una disminución en la síntesis de éstas y otras especies lipídicas como glicerolípidos polares y DAG, tal como ha sido demostrado en el presente trabajo. En células espumosas, en cambio, habría una sobreexpresión de LXR que, conjuntamente con el aumento de la disponibilidad de su ligando, 24,25-epoxicolesterol, produciría un incremento de la expresión de sus genes blanco, como son los que codifican enzimas lipogénicas (GPAT3) y transportadores ABC (ABCA1 y ABCG1). Si bien puede inducirse la síntesis de TAG, en las células espumosas con alto contenido de EC, resultaría más relevante el aumento del flujo de salida de colesterol por incremento de los transportadores ABC, con la consecuente disminución en los depósitos lipídicos observada en el presente trabajo.

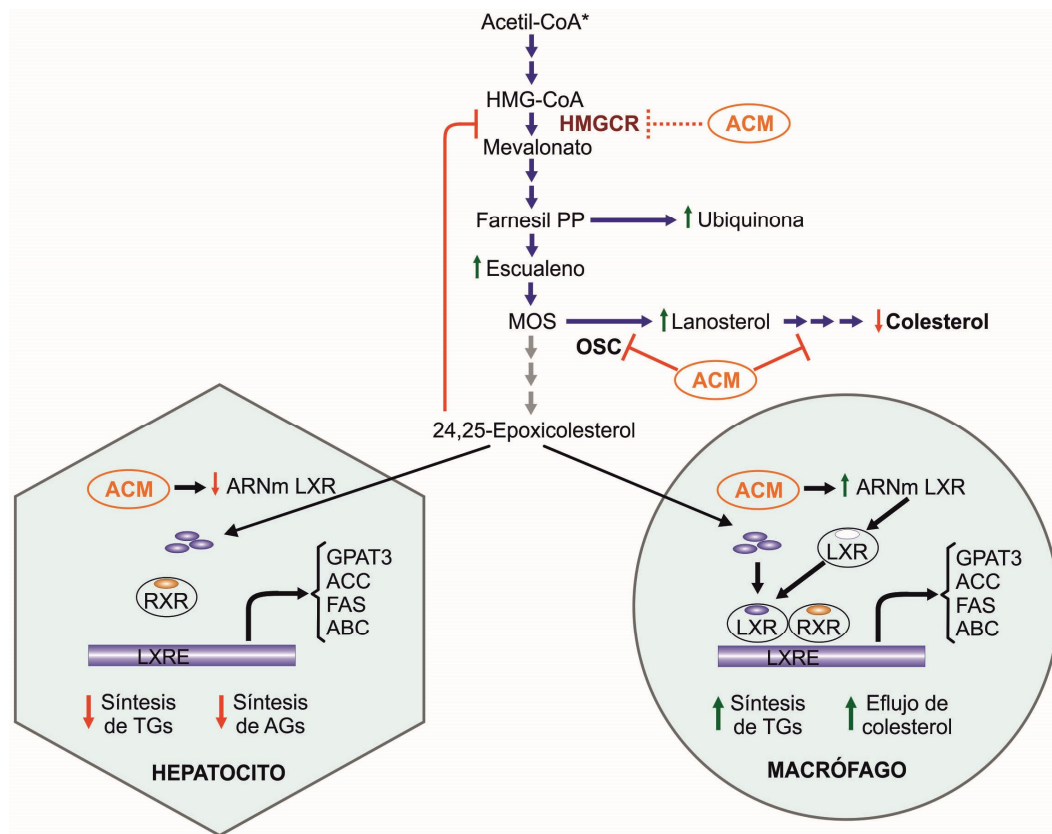


Figura V.17. Mecanismo de acción propuesto para el aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre el metabolismo lipídico a bajas concentraciones. Abreviaturas. LXR: receptor X hepático; RXR: receptor del ácido 9 cis-retinoico; LXRE: elementos de respuesta de LXR; OSC: 2,3-oxidoescualeno:lanosterol ciclasa; HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; MOS: 2,3-oxidoescualeno; TGs: triacilglicéridos; AGs: ácidos grasos.

Altas concentraciones del ACM ( $\geq 60 \mu\text{L/L}$ ), disminuyen en hepatocitos no sólo la síntesis de colesterol, sino también la incorporación de acetato en todos los intermediarios de la VM evaluados como se representa en la Figura V.18. Estos resultados, conjuntamente con reportes previos que demuestran que tanto el Li como el geraniol (monoterpeno estudiado ampliamente en nuestro laboratorio) son capaces de inhibir la actividad de la HMGCR (Clegg et al. 1980; Crespo et al. 2012; Galle et al. 2015), sugieren una inhibición de esta enzima por el ACM.

En células espumosas, la inhibición de las primeras etapas de la VM disminuiría la síntesis y disponibilidad del ligando de LXR (24,25-epoxicoolesterol) con una consecuente reducción en la expresión de sus genes blanco (GPAT3 y ABC). Se sugiere entonces que, el descenso en los depósitos lipídicos estaría relacionado con la reducción en la síntesis de TAG debido a la

## Efecto del aceite de cáscara de mandarina sobre el metabolismo lipídico

disminución de la expresión de GPAT3, y con la inhibición de la síntesis de colesterol a nivel de la HMGCR.

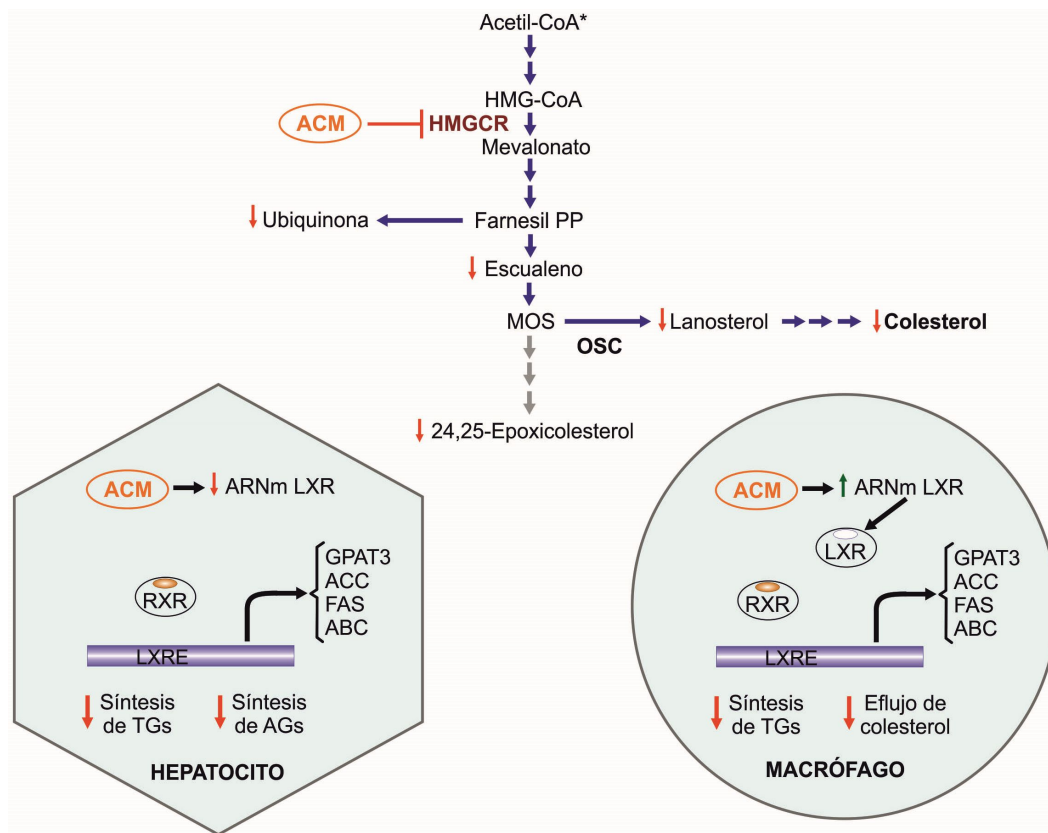


Figura V.18. Mecanismo de acción propuesto para el aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre el metabolismo lipídico a altas concentraciones. Abreviaturas. LXR: receptor X hepático; RXR: receptor del ácido 9 cis-retinoico; LXRE: elementos de respuesta de LXR; OSC: 2,3-oxidoescualeno: lanosterol ciclasa; HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; MOS: 2,3-oxidoescualeno; TGs: triacilglicéridos; AGs: ácidos grasos.

Por lo tanto, se propone que bajas concentraciones del ACM inhiben principalmente enzimas post-escualeno, mientras que altas concentraciones inhiben enzimas pre-escualeno.

Asimismo todos estos resultados demuestran que, si bien el Li es el componente mayoritario del ACM, las células no responden o se comportan exactamente del mismo modo al ser tratadas con el ACM que con el Li. A bajas concentraciones, el Li produciría una mayor inhibición de la OSC que el ACM. Además, debido al acúmulo de lanosterol con el tratamiento con el ACM también se supondría la inhibición de alguna/s otra/s enzima/s de la VM, que participan río abajo del lanosterol. Por otra parte, a diferencia del ACM, el Li no evidenció una reducción

significativa de los depósitos lipídicos. Podemos concluir entonces que los componentes minoritarios del ACM podrían ejercer efectos en los mecanismos de regulación de la VM, con la consecuente reducción de los depósitos lipídicos tanto en hepatocitos como en células espumosas.

Por consiguiente, confirmando la hipótesis inicial se puede concluir que el aceite de la cáscara de *Citrus reticulata*, que posee una mezcla de varios isoprenoides, presenta un gran potencial en el tratamiento de hipercolesterolemias y prevención de aterosclerosis.

# Capítulo VI

Efecto del aceite de  
cáscara de mandarina  
sobre la proliferación  
celular

## VI.1. Ensayos en líneas celulares tumorales en cultivo

### VI.1.1. Efecto del ACM sobre la viabilidad y proliferación celular

Con el fin de evaluar la viabilidad celular en células A549 y HepG2 tratadas con el ACM y el Li, se utilizaron los métodos de MTT y RN. Según ensayos previos del laboratorio realizados en dichas líneas celulares en fase exponencial de crecimiento y crecidas en medio de cultivo suplementado con 10% SFB, estos dos métodos permiten correlacionar la viabilidad celular con la proliferación celular. En estas condiciones de cultivo ambas líneas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes de ACM y Li durante 48 horas con renovación del medio a las 24 horas. Los rangos de dosis utilizadas en los ensayos fueron de 0-600  $\mu\text{L/L}$  ACM/Li. Una vez obtenidos los resultados, se construyeron las curvas de inhibición de la viabilidad celular en función de la concentración del ACM y el Li, y se calcularon los respectivos valores de IC<sub>50</sub> por regresión no lineal utilizando el programa Sigma Plot 10.0 (Figuras VI.1 y VI.2).

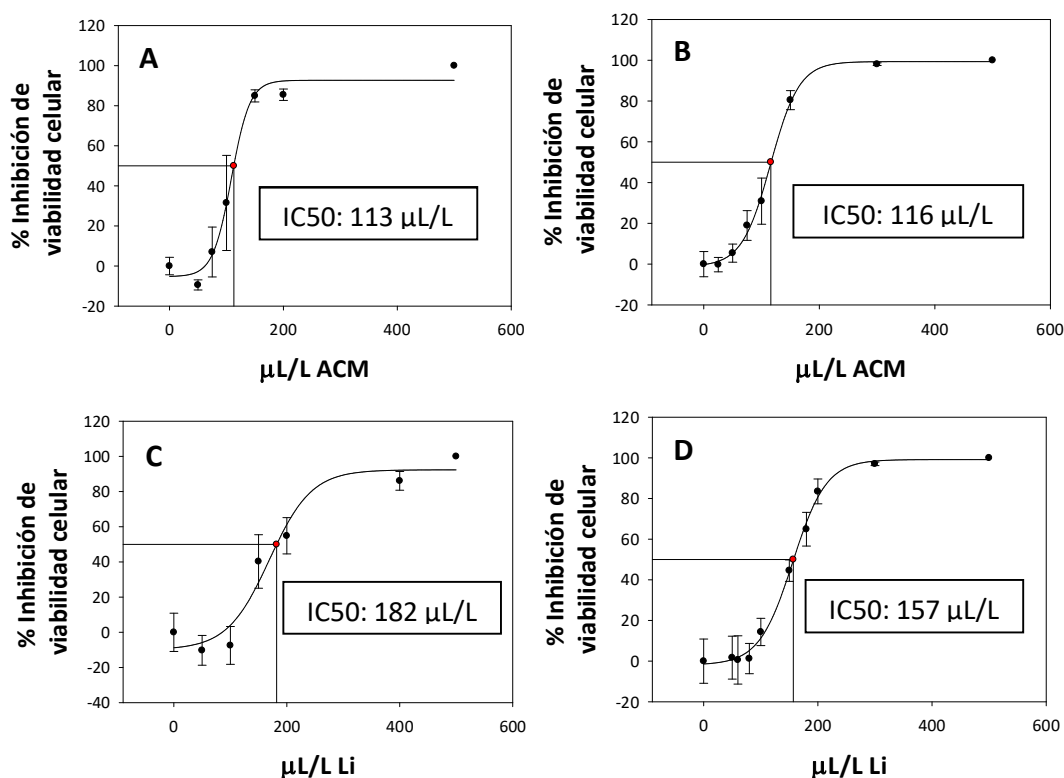


Figura VI.1. Efecto del ACM y Li sobre la viabilidad de células HepG2 y A549 determinada por el ensayo de MTT. Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes del aceite de cáscara de mandarina (ACM) y del limoneno (Li) durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT en las células HepG2 (A y C) y A549 (B y D). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SD (n=4-16).



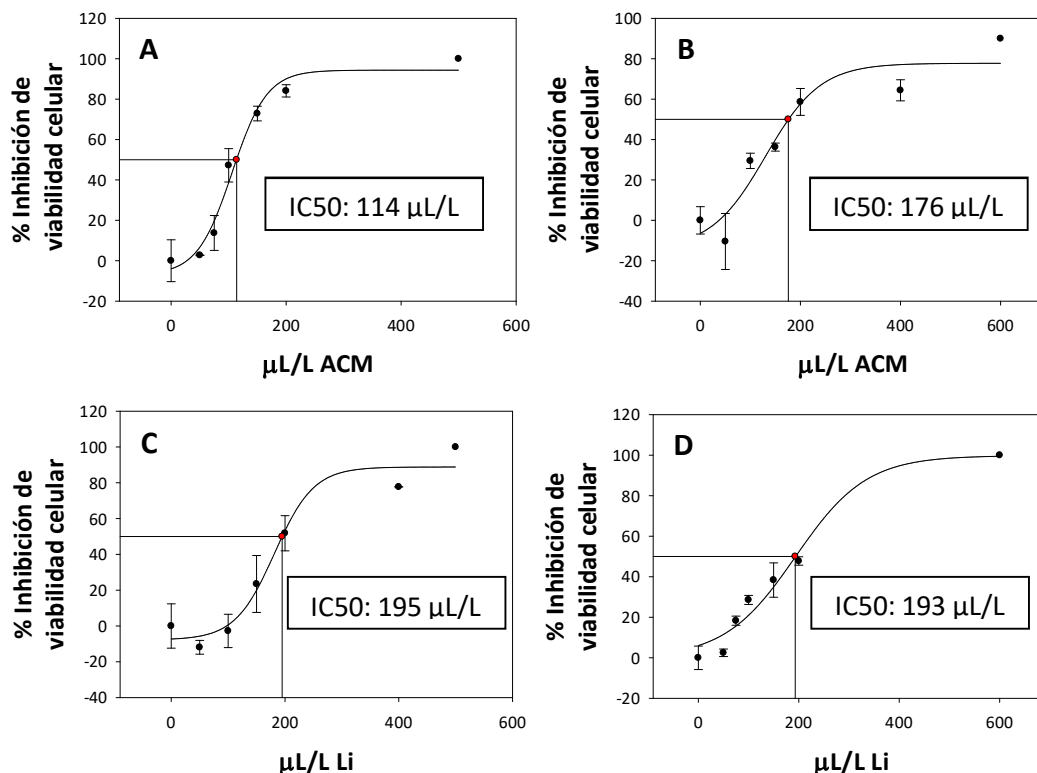


Figura VI.2. Efecto del ACM y Li sobre la viabilidad de células HepG2 y A549 determinada por el ensayo de Rojo Neutro. Las células en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con concentraciones crecientes del aceite de cáscara de mandarina (ACM) y del limoneno (Li) durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de Rojo Neutro en las células HepG2 (A y C) y A549 (B y D). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SD ( $n=4-16$ ).

Los valores de IC50 obtenidos para el ACM y Li por los dos métodos mostraron pequeñas diferencias, en particular en las células A549, en donde los IC50 calculados con MTT fueron entre un 18-34% menores a los calculados con el ensayo de RN. Esta diferencia entre los métodos observada sólo en las células A549 podría deberse a los distintos tipos de metabolismo presentes en ambas líneas celulares. Sin embargo, con los dos métodos se demostró que el ACM posee mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular de ambas líneas (en un rango de 113-176  $\mu\text{L/L}$ ), que su componente mayoritario el Li (en un rango de 157-195  $\mu\text{L/L}$ ), lo que sugiere que la combinación de los distintos compuestos presentes en el ACM, generaría un efecto sinérgico o aditivo sobre la inhibición de la viabilidad celular de HepG2 y A549.

A partir de estos resultados y al hecho de que las células HepG2 no constituyen una línea celular tumorigénica, los ensayos diseñados para su posterior realización fueron exclusivamente en la

línea A549 tratada con el ACM con el fin de evaluar su comportamiento no sólo en las células en cultivo (ensayos *in vitro*) sino también en un modelo de tumor humano xenógrafo implantado en ratones inmunodeprimidos (ratones nude) (ensayos *in vivo*).

### **VI.1.2. Efecto del ACM sobre la progresión del ciclo celular**

#### Distribución de la población celular

Las células en proliferación requieren de la progresión del ciclo celular desde una fase inicial postmitótica G1, a través de S y G2, hasta la fase M donde tendrá lugar la subsiguiente mitosis.

Con el objeto de determinar si la actividad antiproliferativa del ACM está asociada a un arresto del ciclo celular que se refleja en cambios en la distribución de la población en las distintas fases del ciclo, se incubaron células A549 en fase exponencial del crecimiento durante 24 horas con medio MEM suplementado con 10% SFB y con dos concentraciones de ACM, las cuales representan los valores de IC25 e IC50 de viabilidad celular. Posteriormente, las células fueron teñidas con IP y la progresión del ciclo fue analizada por citometría de flujo arrojando los siguientes resultados.

Se demostró que el ACM bloquea la progresión del ciclo celular de las células A549 después de la incubación por 24 horas. Como se muestra en la Figura VI.3, ambas concentraciones evaluadas del ACM causaron un aumento en la población de células en fase G2/M con una simultánea disminución de células en fase S, en comparación con los respectivos controles. Sin embargo, las células tratadas con las concentraciones más altas de ACM (IC50) mostraron cambios significativos en todas las etapas del ciclo, promoviendo un arresto más pronunciado en la fase G0/G1.

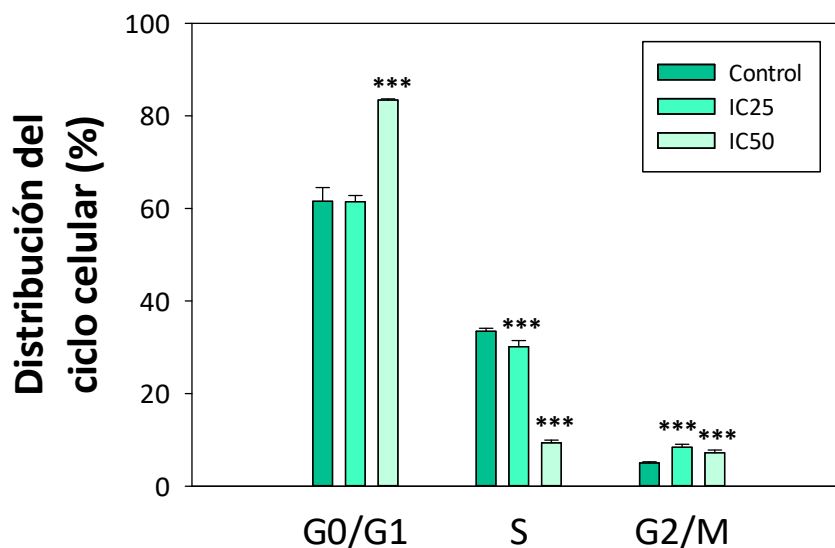


Figura V1.3. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) en la distribución del ciclo celular evaluado por citometría de flujo. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo control.

#### Niveles de ciclinas

Las células A549 fueron tratadas en las mismas condiciones que para el ensayo de citometría de flujo y luego por Western blot se determinaron los niveles de distintas ciclinas, proteínas que cumplen un rol fundamental en la progresión del ciclo celular.

Como se muestra en la Figura VI.4, se observó que los niveles de ciclina E, que juegan un papel crítico en la progresión de la fase G1 a la fase S, disminuyeron significativamente en las células incubadas con altas concentraciones del ACM (IC50). Por el contrario, los niveles de ciclina B1, que disminuyen en las células con una progresión a la fase M, fueron significativamente elevados en las células tratadas con las concentraciones correspondientes a los IC25 e IC50. A su vez, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ciclina D1.

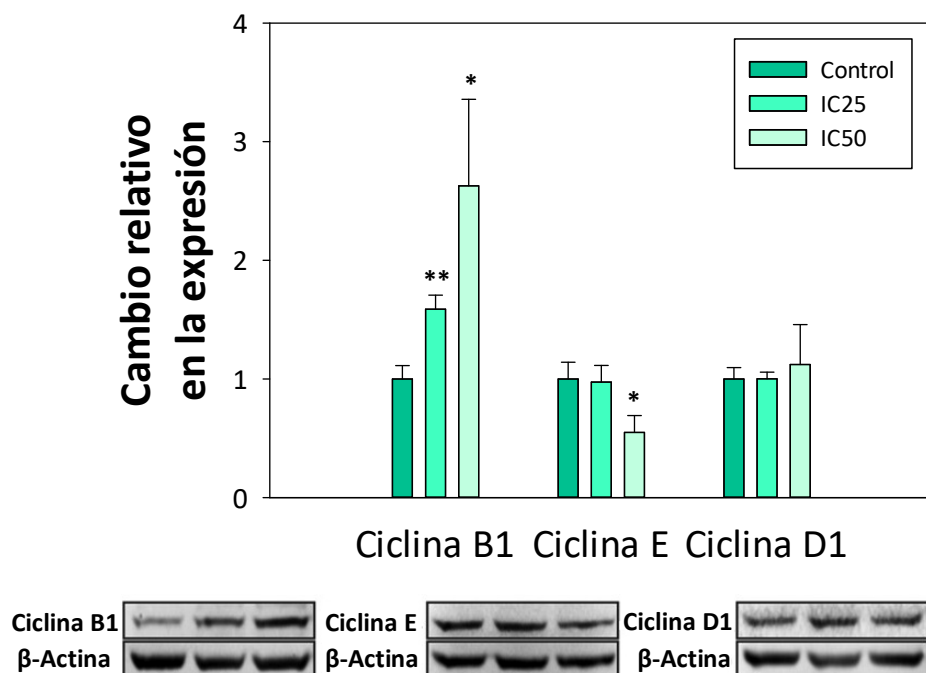


Figura VI.4. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) en la expresión de ciclinas evaluada por Western blot. Cuantificación de los niveles de ciclina B1, E y D1 por análisis densitométrico y sus inmunoblots representativos. Se utilizó β-actina como control de carga. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 4). \*p<0.05, \*\*p<0.01, respecto al grupo control.

### VI.1.3. Efecto del ACM sobre la muerte celular programada o apoptosis

Con el propósito de evaluar la existencia de un efecto pro-apoptótico del ACM se analizó la fragmentación de ADN nuclear por medio del ensayo de TUNEL. Cultivos de células A549 en fase exponencial del crecimiento crecidas sobre cubreobjetos se incubaron con dos concentraciones del ACM (IC25 e IC50 de viabilidad celular) en medio de cultivo suplementado con 10% SFB durante 24 horas. Posteriormente fueron lavadas, fijadas, permeabilizadas y tratadas con el kit de detección de apoptosis detallado en Materiales y Métodos.

Los resultados de la cuantificación de las imágenes obtenidas en células A549 *in vitro* por microscopía de fluorescencia demostraron que tanto bajas (IC25) como altas concentraciones (IC50) del ACM ocasionaron un incremento significativo del porcentaje de células TUNEL positivo (Figura VI.5 A). Además, como se observa en las imágenes representativas de células controles y tratadas con el ACM (Figura VI.5 B), el tratamiento produce una clara disminución del número de células.

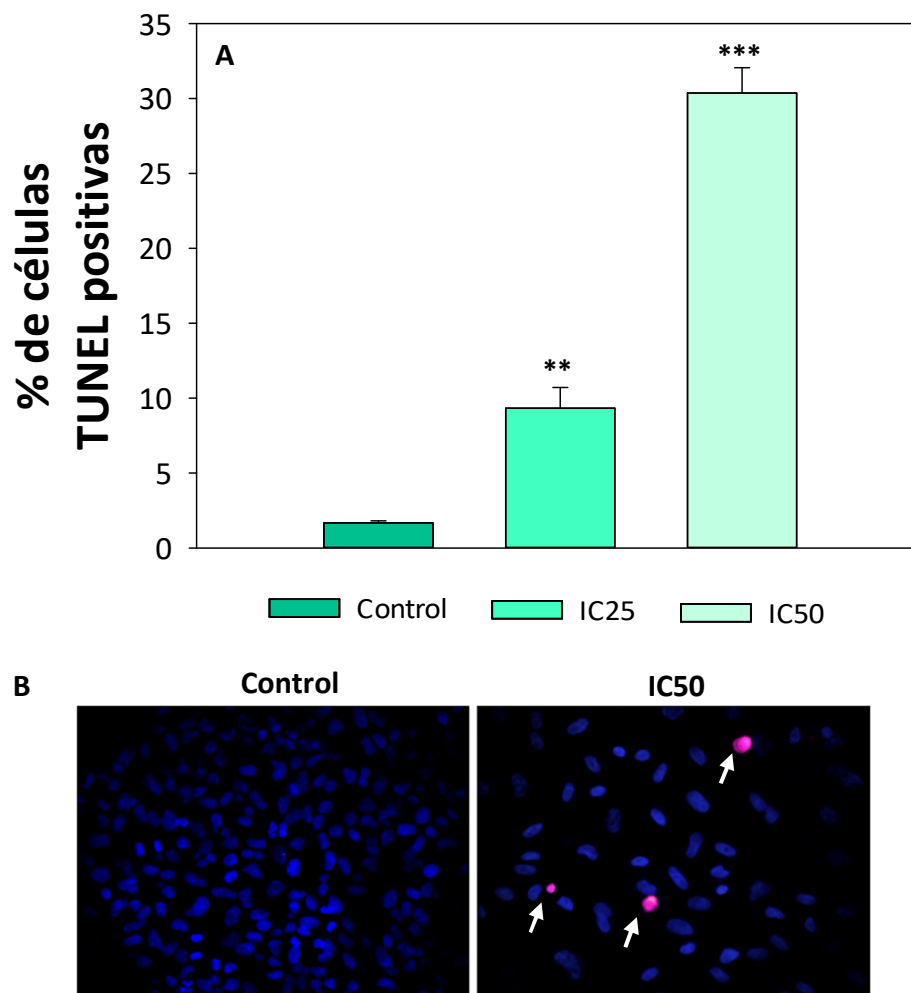


Figura VI.5. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre la apoptosis de células A549 en cultivo. El porcentaje (%) de células apoptóticas se determinó mediante el ensayo TUNEL. (A) Las células TUNEL-positivas en cultivo incubadas con concentraciones de ACM correspondientes a los valores IC25 e IC50 durante 24 horas se contaron en 15 campos aleatorios con 1000 células de 3 situaciones experimentales. (B) Micrografías de fluorescencia de células de control (campo de la izquierda) y células tratadas (campo de la derecha) que muestran células positivas de TUNEL teñidas de rojo (células apoptóticas) y núcleos no apoptóticos teñidos con DAPI. (600 × aumento). Las flechas blancas señalan las células apoptóticas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo control.

## VI.2. Ensayos en ratones nude con desarrollo de tumores provenientes de células A549

Ratones nude fueron implantados subcutáneamente con células A549 tal como se detalló en Materiales y Métodos. Una vez que los animales desarrollaron un tumor de 300 mm<sup>3</sup>

aproximadamente, se procedió a dividirlos en tres lotes: un grupo control y dos grupos experimentales, cada uno de los cuales recibió una dieta suplementada con dosis crecientes del ACM (1.75 y 5.25 mg ACM/ratón/día). El tratamiento tuvo una duración de 21 días. Luego de dicho período, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y sus órganos, tumores y sangre fueron procesados para las posteriores determinaciones.

### VI.2.1. Efecto del ACM sobre el crecimiento tumoral

El efecto del ACM fue evaluado en el crecimiento tumoral en los ratones, midiendo con calibre y dos veces por semana durante el tratamiento, el volumen tumoral. Se observó que, con la dieta suplementada con la dosis mayor de ACM, el crecimiento tumoral disminuyó significativamente con respecto al control, a partir de la primera semana de tratamiento; y con la dieta suplementada con la dosis menor de ACM, el crecimiento tumoral también se redujo con respecto al control, pero no de manera significativa (Figura VI.6).

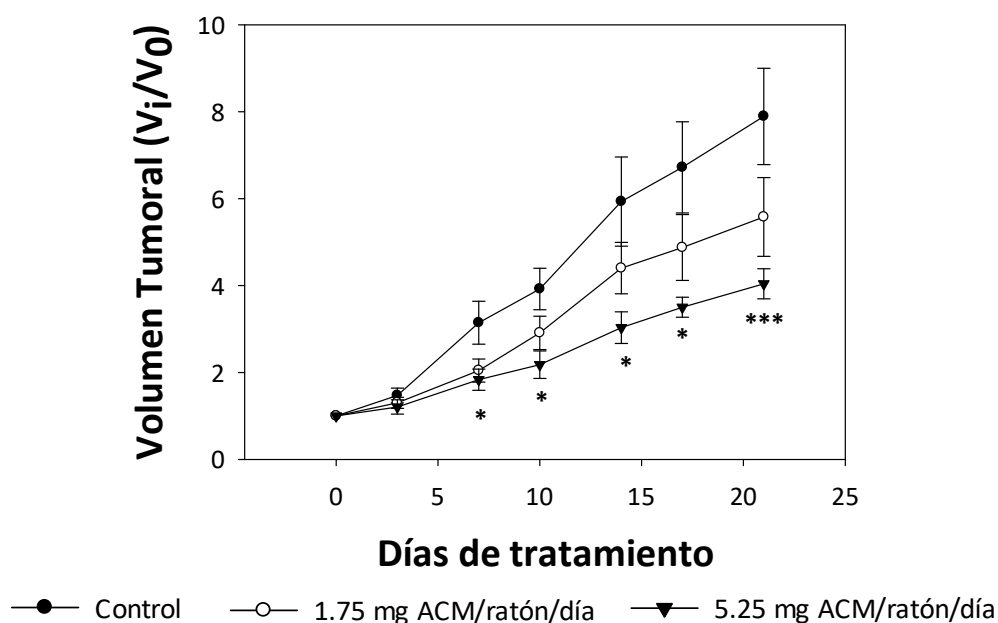


Figura VI.6. Crecimiento tumoral. Ratones nude portadores de tumor ( $300 \text{ mm}^3$  aprox) fueron tratados con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (1.75 y 5.25 mg ACM/ratón/día) durante 21 días. La medición del tamaño tumoral se realizó dos veces por semana. Los valores fueron expresados como la media de 5-6 animales  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo control.

### **VI.2.2. Efecto del ACM sobre la apoptosis y la proliferación celular en tejido tumoral**

#### Descripción histológica del tejido tumoral

Los cortes histológicos de los tumores mostraron características propias de este tipo de tejido. Se determinó una población celular única, formada por múltiples lóbulos separados por finas trabéculas de tejido fibrovascular. Las células presentaron una moderada tendencia a formar cadenas y un moderado pleomorfismo, macrocariosis y alteración de la relación núcleo citoplasma. La evaluación panorámica de los cortes de los tumores mostró que en los animales control había mayor cantidad de áreas de necrosis y de mayor tamaño que en los animales tratados con el ACM. La necrosis tumoral está asociada a procesos de hipoxia, angiogénesis y respuestas inflamatorias que constituyen parámetros de rápido crecimiento y mayor agresividad (Bredholt et al. 2015).

#### Apoptosis

El método de TUNEL fue utilizado para determinar apoptosis en cortes histológicos de tumor. La cuantificación de las células TUNEL positivas demostró un aumento significativo en la apoptosis en los tumores de los animales alimentados con 1.75 mg ACM/ratón/día ( $p < 0.05$ ) y con 5.25 mg ACM/ratón/día ( $p < 0.001$ ) con respecto a los animales controles (Figura VI.7).

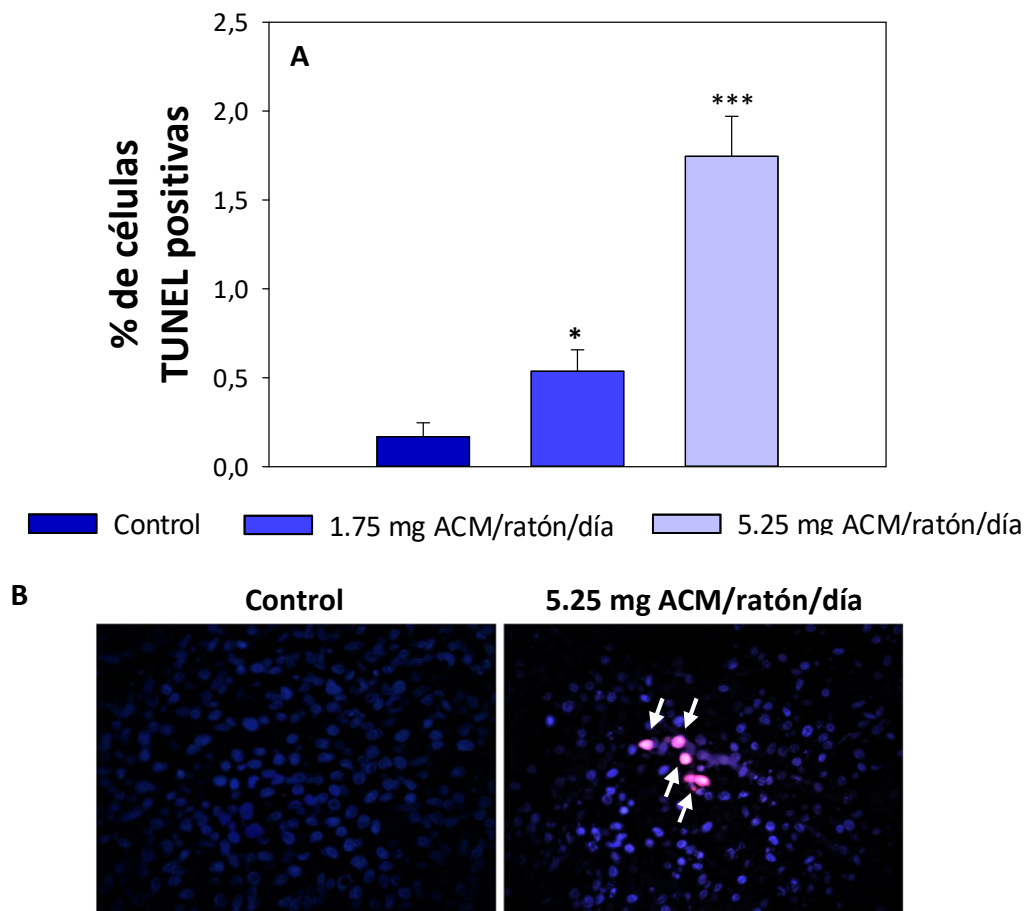


Figura VI.7. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre la apoptosis de células A549 implantadas en ratones nude. El porcentaje (%) de células apoptóticas se determinó mediante el ensayo TUNEL. (A) Las células TUNEL positivas en cortes histológicos de tumor se cuantificaron en 10 campos aleatorios de cada situación experimental (correspondientes a tumores de 5 ratones por lote). (B) Micrografías de fluorescencia de un corte histológico de un tumor control (campo de la izquierda) y de un corte histológico de un tumor tratado (campo de la derecha) que muestran células TUNEL positivas teñidas de rojo (células apoptóticas) y núcleos no apoptóticos teñidos con DAPI. (600 × aumento). Las flechas blancas señalan las células apoptóticas. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al grupo control.

#### Proliferación celular en tejido tumoral

Con el objetivo de evaluar en el tejido tumoral el efecto inhibitorio del ACM sobre la proliferación celular observada en células en cultivo se llevó a cabo un análisis de IM con el anticuerpo PCNA. La cuantificación de las células PCNA positivas mostró que no existen diferencias significativas entre los lotes tratados con el ACM y el lote control. Estos resultados,



que no estarían reflejando una disminución de la proliferación celular en los tumores tratados con el ACM, podrían deberse a que las grandes áreas de necrosis de los tumores controles limitaron las zonas de muestreo, o bien a problemas técnicos que se le atribuyen al método, como variaciones en la intensidad de la tinción, o bien al número de muestras analizadas. Sin embargo, sí se observó una disminución significativa en el porcentaje de células PCNA positivas en el lote tratado con la mayor dosis, con respecto al lote correspondiente al tratamiento con la menor dosis (Figura VI.8).

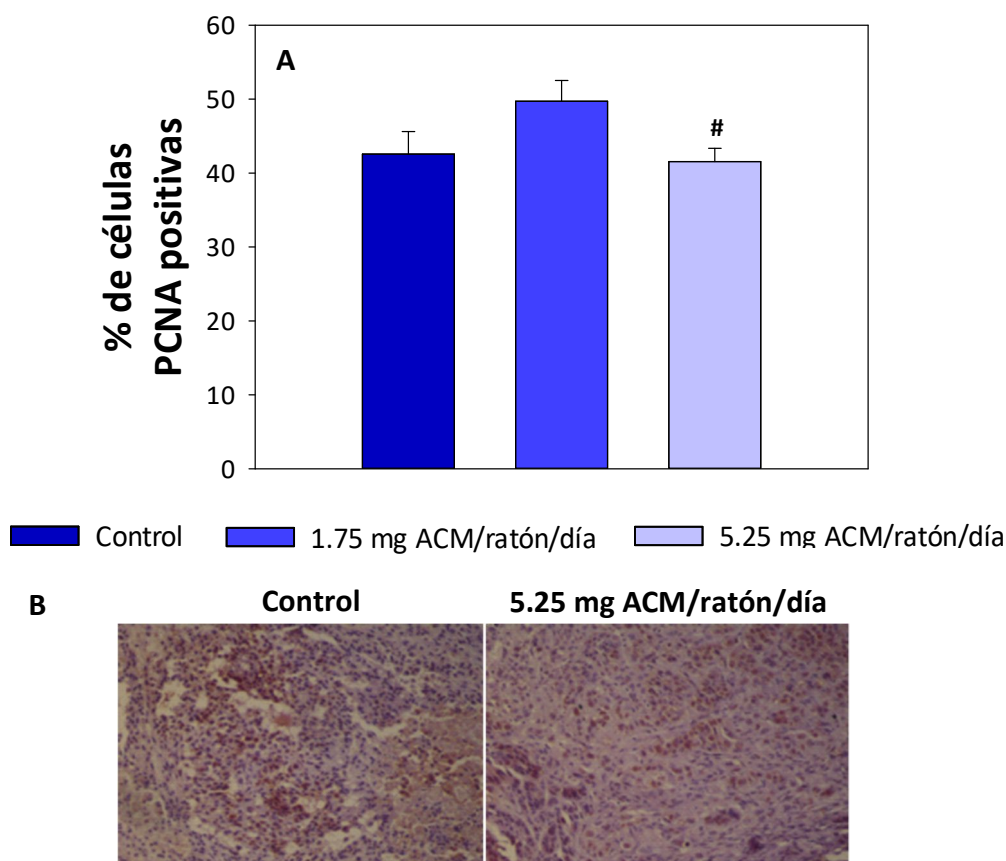


Figura VI.8. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre la proliferación celular. (A) El porcentaje (%) de células positivas a PCNA en cortes histológicos de tejido tumoral se evaluó por la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo para PCNA. Las células PCNA positivas se cuantificaron en 5 campos aleatorios de cada situación experimental (correspondientes a tumores de 3 ratones por lote). (B) Microfotografías de cortes histológicos de tumor de los lotes control (campo de la izquierda) y tratado (campo de la derecha): se muestran las células PCNA positivas (marrones) y las células PCNA negativas (violeta azulado) (400 × aumento). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM.  $\#p < 0.05$ , respecto al lote tratado con 1.75 mg ACM/ratón/día.

### VI.2.3. Efecto del ACM sobre los niveles de proteína Ras

Con el fin de evaluar otro potencial mecanismo mediante el cual el ACM inhibe el crecimiento tumoral, se midieron los niveles de la proteína Ras en MP y homogenato de tumor, ya que es sabido que esta proteína anclada a la membrana desempeña un papel central en la promoción de la proliferación celular.

El análisis por Western blot mostró que los niveles de Ras unida a membrana disminuyeron significativamente en los tumores de ratones tratados con 5.25 mg ACM/ratón/día, con respecto a los tumores control (Figura VI.9 B). Sin embargo, los niveles totales de Ras (que incluyen las proteínas libres en el citosol y las proteínas ancladas a membrana), aunque mostraron una tendencia a incrementarse con los tratamientos, no variaron significativamente en ninguno de los grupos experimentales (Figura VI.9 A). Estos resultados podrían sugerir un incremento en la expresión de las proteínas Ras que no se correlaciona con un aumento en las proteínas ancladas a membrana.

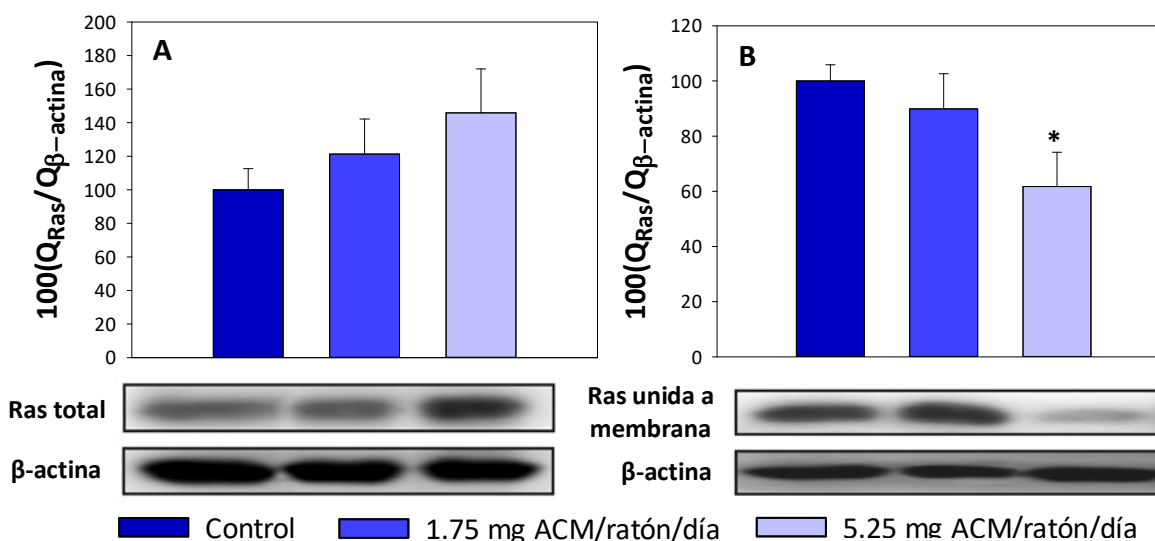


Figura VI.9. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre los niveles de expresión de Ras total (A) y unida a membrana (B) mediante el análisis por Western blot. Paneles superiores: Densidad de las bandas inmunorreactivas de Ras expresada como porcentaje (%) del control utilizando la inmunodetección de  $\beta$ -actina como control de carga. Paneles inferiores: bandas representativas obtenidas por inmunodetección. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM de tumores de 5-6 ratones por grupo. \*p<0.05, respecto al grupo control.

#### VI.2.4. Evaluación de toxicidad

Se utilizaron varios parámetros para evaluar la potencial toxicidad del ACM en los animales.

##### Parámetros morfométricos

No se observaron diferencias significativas entre el lote control y los lotes alimentados con el ACM en el peso corporal sin considerar el peso que le aporta el tumor al animal (Peso final - Peso del tumor). Además, las relaciones entre el peso de los órganos y el peso del animal, así como la cantidad de alimento ingerida por día tampoco variaron entre los distintos lotes (Tabla VI.1).

Parámetro	Unidades	Control	1.75 mg ACM/ratón/día	5.25 mg ACM/ratón/día
<b>Peso Inicial</b>	g	23.53 ± 0.38	24.08 ± 0.62	24.63±0.39
<b>Peso Final</b>	g	23.44 ± 0.52	23.40 ± 0.81	24.50 ± 0.59
<b>Peso Tumor</b>	g	1.20 ± 0.19	1.36 ± 0.23	0.77 ± 0.17
<b>PF-PT</b>	g	22.23 ± 0.40	22.04 ± 0.64	23.75 ± 0.56
<b>PH/PF</b>		0.064 ± 2 × 10 <sup>-3</sup>	0.065 ± 4 × 10 <sup>-3</sup>	0.061 ± 2 × 10 <sup>-3</sup>
<b>PR/PF</b>		0.015 ± 3 × 10 <sup>-4</sup>	0.015 ± 4 × 10 <sup>-4</sup>	0.015 ± 2 × 10 <sup>-4</sup>
<b>PB/PF</b>		0.007 ± 5 × 10 <sup>-4</sup>	0.009 ± 1.1 × 10 <sup>-3</sup>	0.006 ± 5 × 10 <sup>-4</sup>
<b>Alimento ingerido</b>	g/día	3.16 ± 0.20	3.07 ± 0.34	3.12 ± 0.25

Tabla VI.1. Efecto de la ingesta de aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre parámetros morfométricos de los diferentes grupos experimentales. Diversos parámetros asociados a toxicidad fueron medidos a lo largo del tratamiento, tales como el peso inicial (PI) y final (PF) de los animales, el peso del tumor (PT), el peso final corregido por el peso del tumor (PF-PT), las relaciones entre los pesos de los órganos (PH: Peso hígado; PR: Peso riñón; PB: Peso bazo) y el PF de los animales, y la cantidad de alimento ingerido por día. Los valores representan la media de 5-6 animales ± SEM. No se observaron diferencias significativas entre las dosis.

##### Parámetros bioquímicos séricos

El suero obtenido a partir de las muestras de sangre se empleó para determinar la concentración de colesterol, TAG y albúmina, así como también la actividad de las enzimas

indicadoras de daño hepático: AST y ALT. El suero se obtuvo tal cual se detalla en Materiales y Métodos y las determinaciones se realizaron con los kits enzimáticos ya descriptos en dicho capítulo.

Tanto la colesterolemia como la trigliceridemia en los ratones tratados con ACM no fueron significativamente diferentes a las de los ratones control. Los niveles de albúmina tampoco se vieron afectados significativamente por la dieta suplementada con el ACM.

La actividad de ALT no se modificó en los ratones tratados, aunque se observó un aumento significativo en la actividad de AST del lote tratado con la mayor dosis de ACM, con respecto a los ratones control (Tabla VI.2). Sin embargo, este incremento en la actividad de AST no indicaría necesariamente daño hepático ni hepatotoxicidad debido a que, por un lado, la AST no es una enzima específica de hígado (se encuentra también en corazón y músculo) a diferencia de la ALT, que sí lo es y cuyos valores de actividad en los distintos lotes no mostraron cambios significativos. Por otra parte, si bien no se han encontrado referencias bibliográficas para esta especie de ratones, en medicina humana se considera que hay daño hepático cuando la actividad de la AST se incrementa más de 10 veces con respecto a los valores normales, lo cual no sucede en este caso.

Parámetro	Unidades	Control	1.75 mg ACM/ratón/día	5.25 mg ACM/ratón/día
<b>Colesterol</b>	g/l	0.88 ± 0.09	0.90 ± 0.05	0.96 ± 0.06
<b>Triacilglicéridos</b>	g/l	0.78 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.85 ± 0.09
<b>AST</b>	(UI/L)	206.92 ± 23.25	308.12 ± 72.11	328.12 ± 28.81*
<b>ALT</b>	(UI/L)	72.10 ± 9.29	80.17 ± 22.58	95.44 ± 29.07
<b>Albúmina</b>	g/dL	3.48 ± 0.07	3.25 ± 0.14	3.58 ± 0.12

Tabla VI.2. Efecto de la ingesta de aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre parámetros bioquímicos séricos de los diferentes grupos experimentales. Se tuvieron en cuenta parámetros bioquímicos séricos para corroborar que el ACM no fuera perjudicial para los ratones, entre ellos los niveles de colesterol y triacilglicéridos, la actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), y los niveles de albúmina. Los resultados se muestran como la media de 5-6 animales ± SEM. \*p< 0.05, respecto al grupo control.

### Estudios histopatológicos

Los cortes histológicos de diversos órganos como hígado, riñón, intestino y bazo coloreados con hematoxilina y eosina observados con aumentos de 100 × y 200 ×, no evidenciaron lesiones ni cambios en la estructura histológica de los mismos (Figura VI.10).

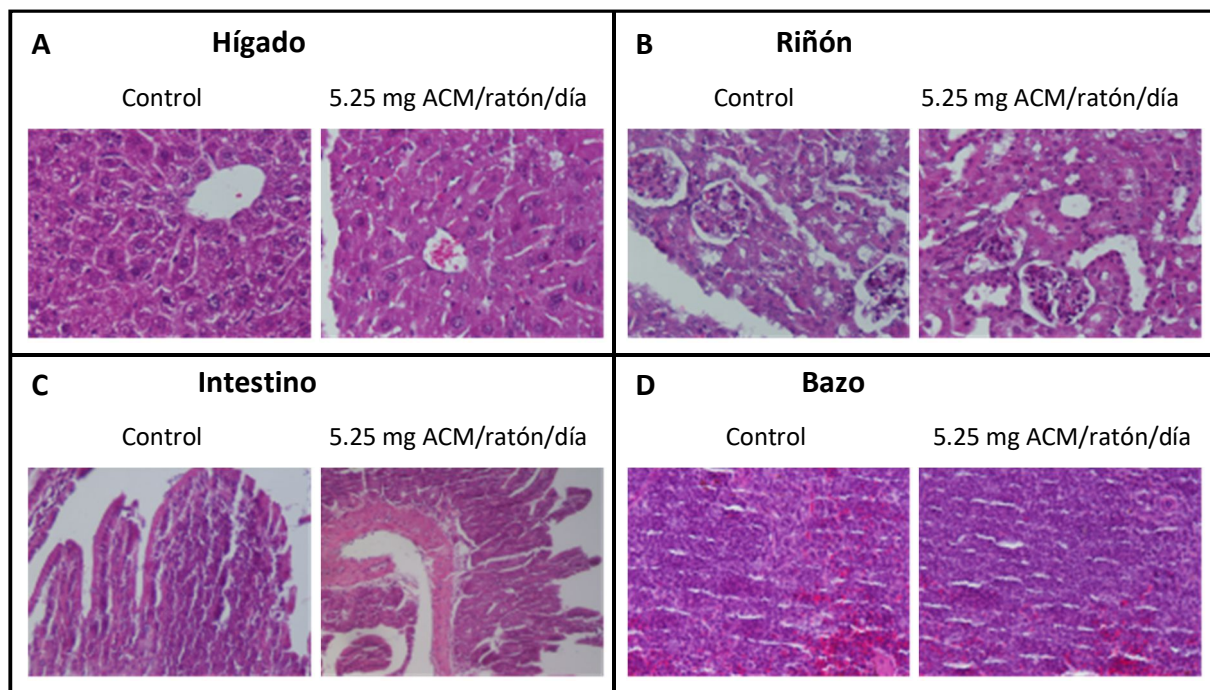


Figura VI.10. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre la histología hepática (A), renal (B), intestinal (C) y del bazo (D) de los grupos experimentales. Imágenes tomadas por microscopía luego de la tinción con hematoxilina-eosina de los cortes histológicos de órganos de ratones nude alimentados con la concentración de ACM que inhibe el crecimiento tumoral en células A549 (5.25 mg ACM/ratón/día), comparados con los controles (400 × aumento).

### Niveles de peroxidación lipídica en hígado y tumor

Los niveles de peroxidación lipídica presentes en hígado y tumor de los distintos grupos (controles y tratados) se evaluaron en los homogenatos de dichos tejidos empleando el método de TBARS. Tal como muestra la Figura VI.11, tanto en hígado como en tumor, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de picomoles de TBARS/μg de proteínas entre los ratones alimentados con ACM y los ratones control. Pese a este resultado, se observó una tendencia al aumento en los niveles de peroxidación lipídica en tumor, así como una disminución de los mismos en hígado.

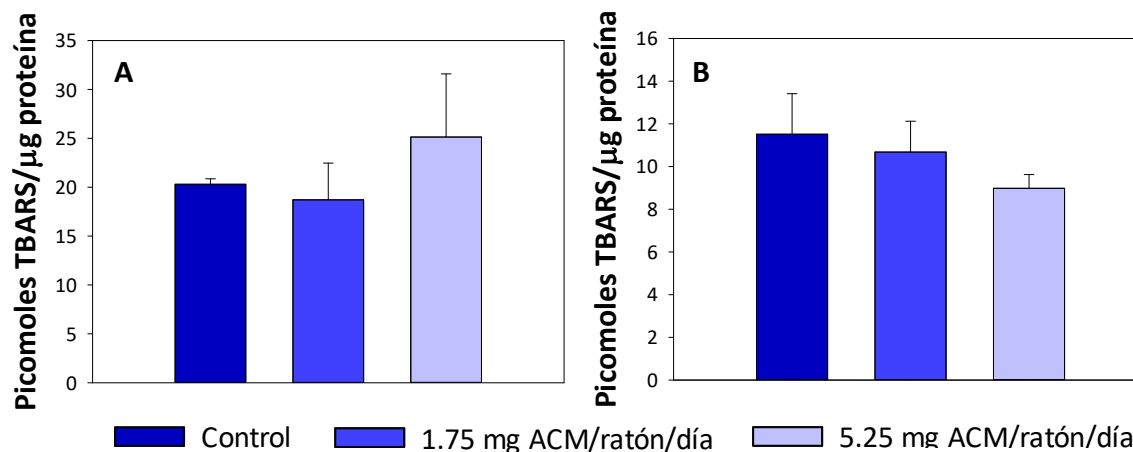


Figura VI.11. Efecto del aceite de cáscara de mandarina (ACM) en la peroxidación lipídica en tejido tumoral (A) y hepático (B). Como parámetro de estrés oxidativo se determinaron las sustancias reactivas al TBA en los ratones alimentados con ACM (dieta control, 1.75 y 5.25 mg ACM/ratón/día). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM, n=4. No se hallaron diferencias significativas entre las dosis ensayadas.

### VI.3. Discusión

Las actividades quimiopreventivas y quimioterapéuticas de los AE, incluidas los de frutas cítricas y monoterpenos puros, están ampliamente descritas (T. C. Chen, Da Fonseca, and Schönthal 2015; Bayala et al. 2014; D. P. De Sousa 2015; Mohamed, El-Emary, and Ali 2010; Yang et al. 2017; Wattenberg and Coccia 1991). Además, los carotenoides, las criptoxantinas y también la vitamina A fueron reportados por mostrar actividades anticancerígenas (Tanaka, Shnimizu, and Moriwaki 2012; Mamede et al. 2011; Nishino 1998) lo que sugiere su posible contribución a la inhibición de la proliferación tumoral.

Sin embargo, al igual que con los carotenoides, los mecanismos de acción no se han dilucidado completamente, y solo unos pocos monoterpenos y AE han alcanzado fases clínicas de investigación (ensayo clínico de fase I) (Jidong Sun 2007; T. C. Chen, Da Fonseca, and Schönthal 2015). Entre éstos, el Li ha demostrado su biodisponibilidad y seguridad, y existe evidencia preclínica de sus efectos anticancerígenos en humanos, aunque los estudios hasta la fecha se han centrado en su uso en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama (J. A. Miller et al. 2011, 2013). Se demostró que el Li induce la apoptosis (Jia et al. 2013; S C Chaudhary et al. 2012) e inhibe la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de la isoprenilación de proteínas G pequeñas, tales como las oncoproteínas Ras, y la disminución de los niveles de

ARNm de ciclina D1 (Crowell et al. 1991; Bardon, Picard, and Martel 1998). Debido a que el Li es el componente mayoritario en la mayoría de los aceites de los frutos cítricos (Steuer, Schulz, and Läger 2001), mecanismos similares podrían estar implicados en la inhibición del crecimiento de células tumorales por los aceites de estos frutos.

En el presente trabajo se demostró que el ACM ejerce efectos inhibidores del crecimiento sobre células tumorales humanas A549 al inducir el arresto del ciclo celular y la apoptosis. A partir de bajas concentraciones (IC25), el ACM detuvo el ciclo celular en la fase G2/M en paralelo con el incremento en los niveles de ciclina B1. Estos resultados sugieren que el ACM arresta las células en alguna etapa entre la metafase y la telofase, cuando los niveles de ciclina B1 permanecen aún elevados. Sin embargo, a una concentración más alta (IC50), el ACM también promovió un aumento de la población de células en G0/G1. Esta última se acompaña de una disminución en la expresión de ciclina E, una proteína reguladora del ciclo celular esencial para la progresión de G1 y la transición a la fase S (Lim and Kaldis 2013; Mazumder, DuPree, and Almasan 2004). En ambos casos, el arresto se caracterizó por una disminución significativa en las células en fase S.

Considerando que las células con rápido crecimiento requieren no sólo de la síntesis de ácidos nucleicos (involucrados en la progresión del ciclo celular) sino también de lípidos y proteínas, distintas vías del metabolismo lipídico están estrechamente vinculadas a los procesos tumorigénicos. En algunos tipos de cáncer, como el de próstata, se ha demostrado que el aumento de la síntesis de AG y colesterol se correlaciona con la progresión tumoral y con un mal pronóstico de la enfermedad (Pelton, Freeman, and Solomon 2012; Zadra, Photopoulos, and Loda 2013). A su vez, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de AG y FL (en particular FC, constituyente fundamental de las membranas celulares) detiene las células en mitosis antes de las etapas de anafase y telofase (Scaglia et al. 2014). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que ciertos monoterpenos puros y AE de plantas aromáticas inhiben enzimas lipogénicas como la HMGCR y la ACC, enzimas claves en la síntesis de colesterol (VM) y AG respectivamente, así como la síntesis de FL y TAG (Kladniew et al. 2014; Galle et al. 2015; Montero-Villegas et al. 2017; Crespo et al. 2012). De acuerdo con esta información y a los resultados obtenidos en este trabajo (detallados principalmente en el Capítulo V), se propone que el ACM podría modular rutas metabólicas lipídicas que son capaces de afectar la proliferación de las células cancerígenas. En particular, la inhibición de la VM disminuye no sólo



la síntesis de colesterol sino también la de grupos prenilos que al ser añadidos por las prenil-proteín transferasas a proteínas como las Ras GTPasas o las proteínas G triméricas cumplen un rol fundamental para que éstas puedan anclarse a la membrana y activen distintas cascadas de respuesta celular. Asimismo se ha propuesto que los isoprenoides podrían inhibir directamente las prenil-proteín transferasas (Hardcastle et al. 1999; Mo and Elson 2004; Sandeep Chand Chaudhary et al. 2013).

Las proteínas Ras preniladas por ejemplo, debido a su papel central en la oncogénesis (Sever and Brugge 2015), se consideran blancos terapéutico prometedores para el control de varias células tumorales (Lu et al. 2016). Estas proteínas funcionan en una red de señalización compleja que incluye las rutas Ras-ERK y PI3K-Akt que regulan numerosos procesos celulares, entre ellos la proliferación celular y la apoptosis (A.-L. Cao et al. 2015; Bar-Sagi and Hall 2000; Castellano and Downward 2011). Los efectores citoplasmáticos de estas cascadas pueden activar o inactivar los complejos Cdk-ciclina que dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular mediante distintos mecanismos previamente descritos en la Introducción. Entre ellos, el proceso de degradación de las ciclinas puede definir el avance o detención del ciclo en los distintos puntos de control (*checkpoints*). Particularmente para el complejo Cdk-G1/S, formado por Cdk2/ciclina E, Minella y colaboradores (2005) han determinado que la actividad oncogénica de Ras regula la degradación de ciclina E a través de la proteína supresora tumoral, ubiquitin ligasa Fbw7 (Minella, Welcker, and Clurman 2005). La activación de la vía Ras-Erk impide la ubiquitinación y proteólisis de esta ciclina con la consecuente activación del complejo que promueve el pasaje de la célula hacia la fase S del ciclo. En nuestro caso, el arresto del ciclo observado a este nivel (arresto G0/G1) por el ACM podría ser consecuencia de la disminución de grupos prenilos o bien del colesterol componente de las balsas lipídicas de la membrana, que impedirían la activación de la proteína Ras y su regulación en la degradación de la ciclina E.

Por otro lado, el complejo Cdk-M constituido por Cdk1/ciclina B1, interviene en la transición de metafase a anafase y es regulado por el APC/C quien cataliza la degradación de la ciclina B1 (entre otras proteínas). Se ha postulado que efectores metabólicos de cascadas activadas por proteínas preniladas (Ras y G triméricas) como la proteína quinasa A y la proteína supresora tumoral RASSF1 regularían al complejo APC/C (Kotani et al. 1998; Bolte et al. 2003; Searle et al. 2004; Chow et al. 2012; Song et al. 2004). El arresto en la fase G2/M observado en las células



tratadas con ACM sugeriría que la inactivación de las proteínas preniladas podrían estar relacionadas con una inactivación del complejo APC/C que se corresponde con un incremento en la ciclina B1 que no ha sido degradada. En base a todos estos estudios se hipotetiza que el descenso en los niveles de Ras en membrana plasmática tumoral podría ser uno de los mecanismos antiproliferativos ejercidos por el ACM, conduciendo a la detención del ciclo celular y a la inducción de la apoptosis.

Por otro lado cabe destacar que el ACM demostró no poseer efectos tóxicos en ratones. En el presente trabajo se evaluaron diferentes parámetros que muestran que las concentraciones de ACM que disminuyen el crecimiento tumoral no inducen toxicidad sistémica en el modelo murino evaluado. Se demostró que el ACM no produjo cambios en el peso corporal, uno de los indicadores más sensibles de efectos adversos (Alemáan et al. 1998; Guideline and Guideline 2001), ni en el peso, la morfología y la histología de los diferentes órganos. Además ciertos marcadores de la función hepática, como el colesterol, los TAG, la albúmina y la ALT plasmáticos, tampoco muestran diferencias significativas con respecto a los respectivos controles; sólo AST aumentó su actividad en ratones tratados con la mayor concentración de ACM. Sin embargo, el aumento en este único parámetro no determina necesariamente un efecto tóxico del ACM en el hígado dada la inespecificidad tisular de esta enzima y al bajo orden de magnitud del aumento detectado.

Estos resultados, sumado a que los AE están incluidos en el listado de productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) en alimentos y bebidas, según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos, sugiere su gran potencial como agente natural antitumoral.

# Capítulo VII

## Efecto antioxidante del aceite de cáscara de mandarina

Basados en numerosos reportes del efecto antioxidante y antitumoral de monoterpenos y AE, se evaluaron distintos parámetros y estrategias metodológicas con el fin de demostrar el potencial antioxidante del ACM en el marco de la prevención de enfermedades estrechamente asociadas con el estrés oxidativo, como son la aterosclerosis y el cáncer.

Se evaluó el efecto del ACM y el Li sobre la oxidación lipídica de LDL incubadas con  $\text{CuSO}_4$  como compuesto oxidante (ítem VII.1). El mismo agente oxidante se utilizó para inducir estrés oxidativo en células tumorales A549 y evaluar el efecto del ACM y Li sobre la peroxidación lipídica en dichas condiciones experimentales (ítem VII.2). Por último, la peroxidación de lípidos así como la actividad de enzimas reguladoras del estado redox celular, se evaluaron en células con un estado redox fisiológico (ítem VII.3) con el objetivo de ahondar en los mecanismos de acción que desencadena el ACM.

### VII.1. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica de LDL

LDL nativas se incubaron con concentraciones crecientes de ACM y Li (2-250  $\mu\text{L/L}$ ) y se oxidaron con  $\text{CuSO}_4$  (20  $\mu\text{M}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 horas. Se midió la peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS.

Como resultado se pudo evidenciar que tanto el ACM como el Li redujeron los niveles de oxidación de los compuestos lipídicos de LDL coincubadas con  $\text{CuSO}_4$ . El efecto de inhibición de la oxidación de LDL fue mayor en los tratamientos con el ACM (Figura VII.1).

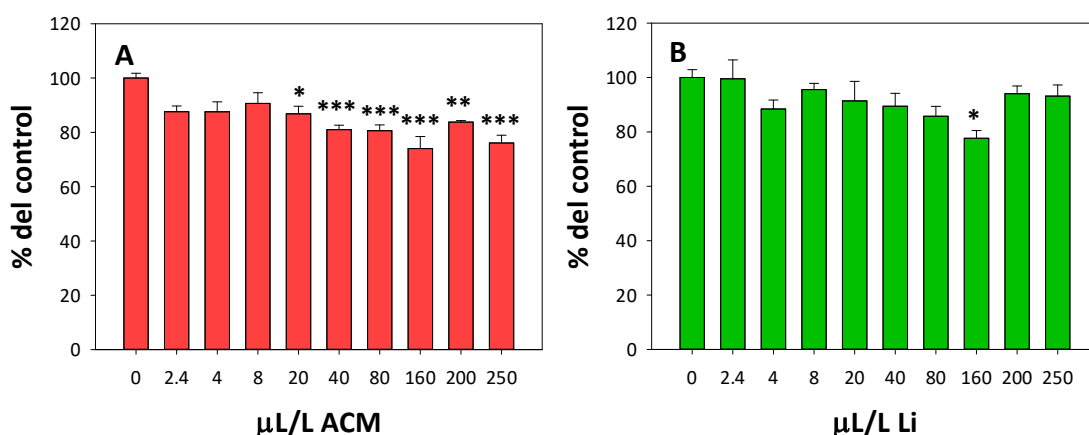


Figura VII.1. Niveles de oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) nativas coincubadas con concentraciones crecientes de aceite de cáscara de mandarina (ACM) o limoneno (Li) y  $\text{CuSO}_4$ . (A) LDL + ACM +  $\text{CuSO}_4$ . (B) LDL + Li +  $\text{CuSO}_4$ . Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , respecto al control.

### VII.2. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica de células A549 incubadas con $\text{CuSO}_4$

Se evaluó el efecto del ACM y Li en células expuestas al agente inductor de estrés oxidativo  $\text{CuSO}_4$  para lo cual se determinó mediante el ensayo de MTT el valor de  $\text{IC}_{50}$  del  $\text{CuSO}_4$  en la línea celular A549 con el objetivo de determinar las concentraciones a utilizar (Figura VII.2).

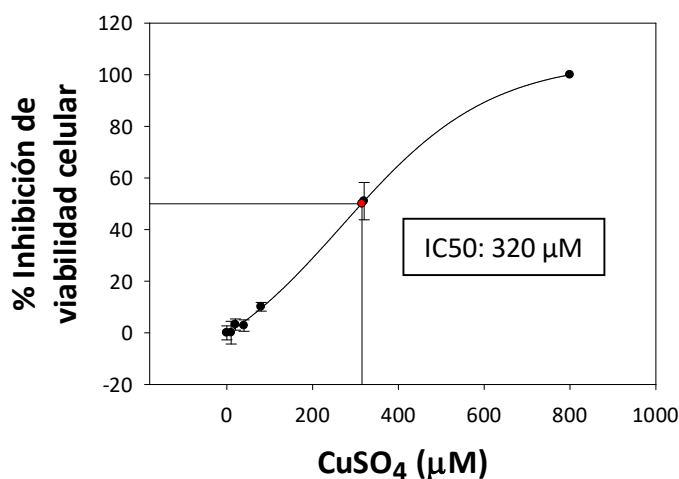


Figura VII.2. Curva de porcentaje (%) de Inhibición de la viabilidad celular vs. concentración de  $\text{CuSO}_4$  realizada en células A549 a 24 horas, y su respectivo valor de  $\text{IC}_{50}$  calculado.

Para este experimento se utilizó una concentración de  $\text{CuSO}_4$  de 250  $\mu\text{M}$ , la cual no inhibe más del 50% la viabilidad celular pero induce estrés oxidativo. Las concentraciones del ACM y Li se seleccionaron en función de los ensayos de viabilidad celular realizados en células A549 tratadas durante 24 horas, los cuales arrojaron valores de  $\text{IC}_{50}$  de 130 y 150  $\mu\text{L/L}$  de ACM y Li respectivamente. A partir de los resultados obtenidos, se propusieron dos grupos experimentales para cultivo celular: aquellos incubados con concentraciones menores al  $\text{IC}_{50}$ , consideradas bajas, y aquellos incubados con concentraciones cercanas o iguales al  $\text{IC}_{50}$ , consideradas altas.

Los cultivos celulares en fase exponencial del crecimiento fueron incubados simultáneamente con  $\text{CuSO}_4$  y ACM o Li, en MEM con SFB durante 24 horas. Luego de este tiempo de incubación, las células fueron cosechadas y fueron medidos los niveles de peroxidación lipídica de cada muestra.

Se determinó un aumento significativo de los picomoles de TBARS/ $\mu\text{g}$  proteína para el control positivo de  $\text{CuSO}_4$ . Los niveles de oxidación disminuyeron significativamente luego de los

tratamientos con ACM, y posteriormente a la coincubación de ACM y  $\text{CuSO}_4$ , éstos se revirtieron a valores cercanos al control. En el caso del Li, se observó una tendencia similar (Figura VII.3).

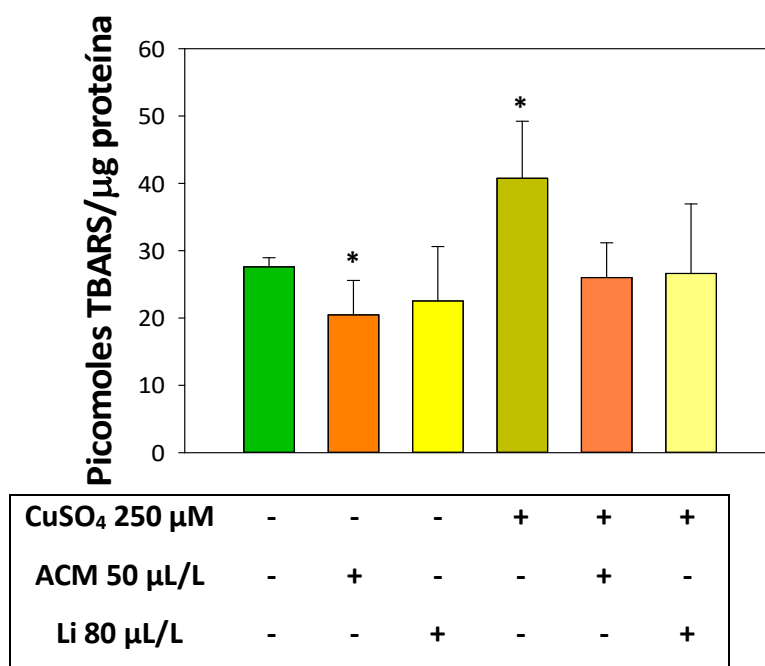


Figura VII.3. Niveles de peroxidación lipídica en células A549 medidos por el ensayo de TBARS luego de los tratamientos de 24 horas con  $\text{CuSO}_4$  y aceite de cáscara de mandarina (ACM) o limoneno (Li). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=3-9). \* $p < 0.05$ , respecto al control.

### VII.3. Efecto del ACM sobre la peroxidación lipídica y la actividad de enzimas del sistema antioxidante en células A549

Basados en resultados previos del laboratorio que demostraron que monoterpenos como el geraniol ejercen un efecto dual sobre el estado redox de A549 (Soberón 2017), evidenciando una actividad anti- o pro-oxidante en función de su concentración y del tiempo de tratamiento, se realizaron ensayos con distintas concentraciones y tiempo de incubación. Con el objetivo de evaluar la capacidad antioxidante del ACM y el Li, se seleccionaron concentraciones bajas de los mismos, las cuales se ensayaron durante 3 horas en las células con medio de cultivo con SFB. Luego de este tiempo de incubación, las células fueron cosechadas y se midieron los niveles de peroxidación lipídica mediante el ensayo de TBARS, así como la actividad enzimática de CAT, SOD y GST por espectrofotometría.

Tal como muestra la Figura VII.4, luego de los tratamientos con ACM se evidenció una

disminución en los niveles de peroxidación lipídica que fue estadísticamente significativa a partir de 50  $\mu\text{L/L}$ . En el caso del Li, sólo se observó una tendencia a la disminución de los niveles de oxidación lipídica.

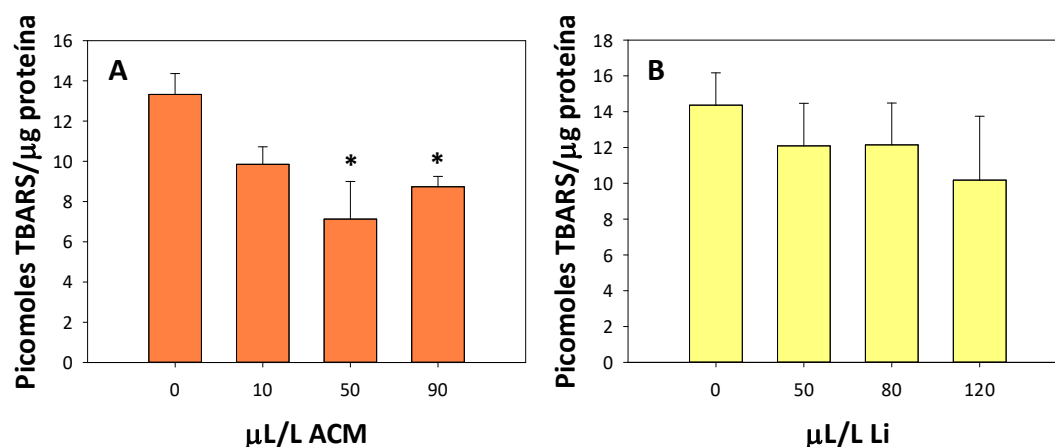


Figura VII.4. Niveles de peroxidación lipídica en células A549 medidos por el ensayo de TBARS luego de los tratamientos de 3 horas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) y limoneno (Li) (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=3). \*p< 0.05, respecto al control.

Asimismo se observó un aumento (aunque no siempre estadísticamente significativo) en la actividad de las tres enzimas evaluadas, CAT, SOD y GST, en las células tratadas con el ACM o con el Li. En el caso del ACM, el incremento de la actividad enzimática fue significativo a concentraciones mayores a 50 ó 90  $\mu\text{L/L}$  (según la enzima); pero con el Li, sólo se evidenció un aumento significativo para la enzima catalasa en las concentraciones más elevadas (Figura VII.5).

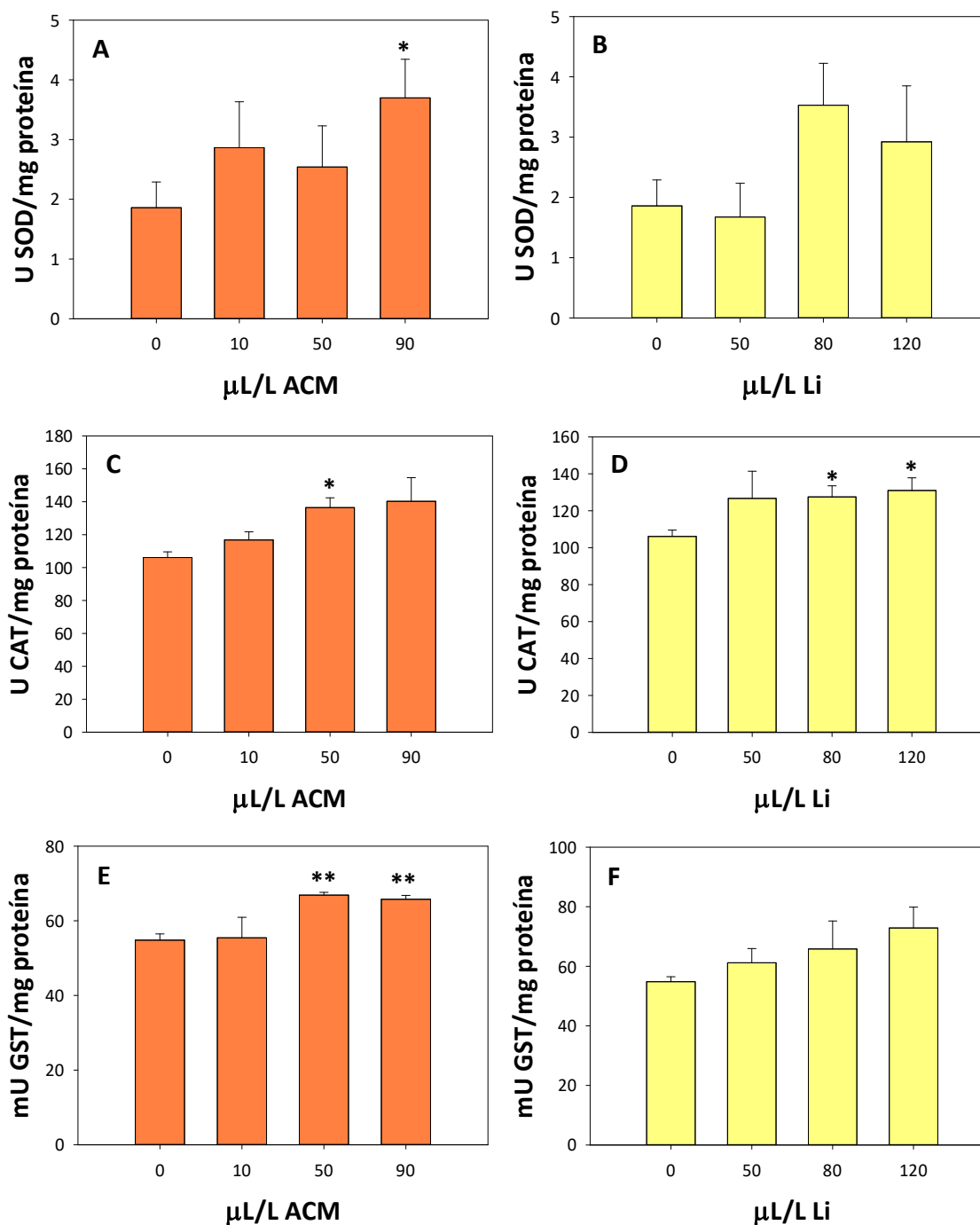


Figura VII.5. Actividades enzimáticas en células A549 luego de los tratamientos de 3 horas. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) luego del tratamiento con ACM (A) y Li (B). Actividad de catalasa (CAT) luego del tratamiento con ACM (C) y Li (D). Actividad de glutatión-S-transferasa (GST) luego del tratamiento con ACM (E) y Li (F). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=3-4). \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, respecto al control.

Por otro lado, para determinar la actividad prooxidante del ACM y el Li, se seleccionaron concentraciones altas de los mismos, y se trataron las células durante 24 horas en medio de cultivo con SFB. Luego de este tiempo de incubación, las células fueron cosechadas y fueron medidos los niveles de peroxidación lipídica y la actividad enzimática de CAT, SOD y GST.

Tal como muestra la Figura VII.6, se determinó luego de los tratamientos con ACM una disminución en los niveles de picomoles de TBARS/ $\mu\text{g}$  proteína, la cual se hizo más notoria y significativa para las concentraciones más altas ensayadas. En el caso del Li, sólo se observó una tendencia a la disminución de los niveles de peroxidación lipídica en algunas de las concentraciones ensayadas.

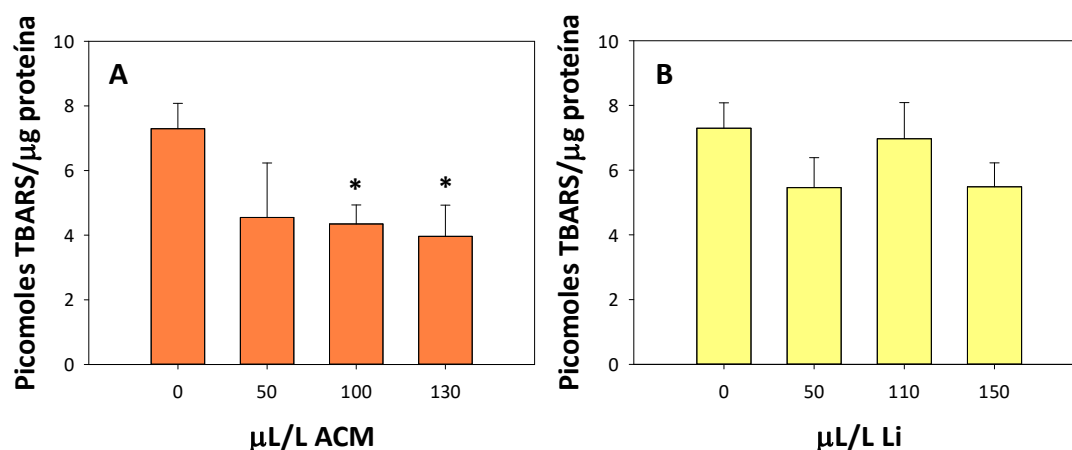


Figura VII.6. Niveles de peroxidación lipídica en células A549 medidos por el ensayo de TBARS luego de los tratamientos de 24 horas con aceite de cáscara de mandarina (ACM) (A) y limoneno (Li) (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=3-4). \*p < 0.05, respecto al control.

Las determinaciones demostraron que, en general, la actividad enzimática de las células tratadas con ACM y Li fue más elevada que el valor del control, aunque sólo se evidenció un aumento significativo en el caso de la SOD luego de tratar los cultivos celulares con 100  $\mu\text{L/L}$  de ACM y 110  $\mu\text{L/L}$  de Li (Figura VII.7).



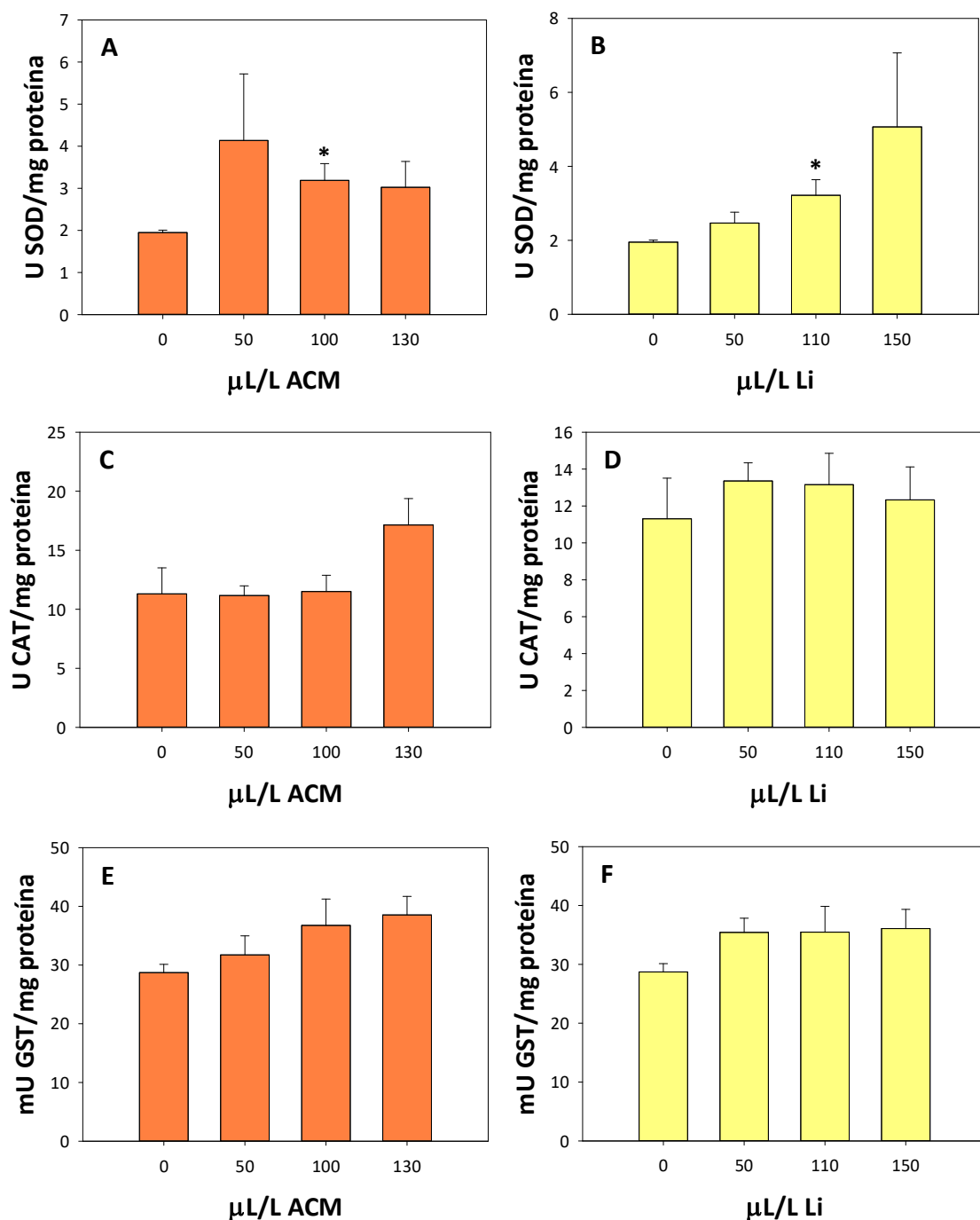


Figura VII.7. Actividades enzimáticas en células A549 luego de los tratamientos de 24 horas. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) luego del tratamiento con ACM (A) y Li (B). Actividad de catalasa (CAT) luego del tratamiento con ACM (C) y Li (D). Actividad de glutatión-S-transferasa (GST) luego del tratamiento con ACM (E) y Li (F). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n=3-4). \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, respecto al control.

Todos estos ensayos demostrarían la capacidad antioxidante del ACM, tanto a altas como a bajas concentraciones, la cual estaría, al menos en parte, inducida por la activación de enzimas responsables de la homeostasis del estado redox celular.

### VII.4. Discusión

Tal como se describió en el capítulo IV, los principales componentes lipídicos del ACM son monoterpenos y carotenoides.

Varios estudios han demostrado la actividad antioxidante de ciertos monoterpenos como carvona y  $\alpha$ -terpineol (Bicas et al. 2011), 1,8-cineole y  $\alpha$ -pineno (Wannes et al. 2010),  $\gamma$ -terpineno y terpinoleno (Ruberto and Baratta 2000), p-cimeno (de Oliveira et al. 2015) y Li (Roberto et al. 2010), entre otros (Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos 2012). Además, se ha evidenciado la capacidad secuestradora de radicales libres o actividad scavenger de algunos AE de cítricos (Singh et al. 2010) y de plantas aromáticas (Dorman, Surai, and Deans 2000).

Si bien los monoterpenos en general poseen potencial antioxidante (Gonzalez-Burgos and Gomez-Serranillos 2012) el estudio de una gran variedad de ellos ha demostrado que existe una relación entre la estructura y la actividad antioxidante de los mismos (Dorman, Surai, and Deans 2000; Amorati, Foti, and Valgimigli 2013). Se demostró que los compuestos fenólicos son los que poseen el mayor efecto antioxidante y que la posición que ocupa el grupo hidroxilo también influye en esta propiedad. El componente monoterpénico mayoritario del ACM, el Li, no posee grupos hidroxilos en su estructura, por lo que la menor capacidad antioxidante que demostró poseer este compuesto con respecto al ACM sugiere que componentes minoritarios del mismo tendrían una mayor capacidad antioxidante, o bien que la combinación de los distintos compuestos presentes en el ACM (entre ellos el Li) podrían estar ejerciendo un efecto sinérgico o aditivo.

Por otro lado, en este trabajo se demostró la presencia de carotenoides libres y esterificados en el ACM, compuestos cuya actividad antioxidante está ampliamente reportada en la bibliografía (N. J. Miller et al. 1996; Stahl and Sies 2003; Fu et al. 2010). Pisoschi y colaboradores (2015) describieron que debido a su estructura, ciertos carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y el licopeno son capaces de reaccionar mediante diversos mecanismos con las especies de radicales libres oxigenados permitiendo su eliminación o transformación (Pisoschi and Pop 2015). A pesar de

que la mayoría de los estudios disponibles en la literatura muestran el efecto antioxidante de los carotenoides no esterificados, algunos informes señalan que la esterificación del grupo hidroxilo con AG no altera las propiedades antioxidantes de los carotenoides, sino que por el contrario, los estabiliza aún más contra la degradación del calor (Fu et al. 2010).

El potencial antioxidante del ACM fue demostrado en este trabajo por disminuir los niveles de peroxidación lipídica en LDL humanas y en células en cultivo incubadas con un agente inductor de estrés oxidativo, así como por incrementar en las células en cultivo en un estado redox fisiológico la actividad de enzimas fundamentales del sistema antioxidante celular como son CAT, SOD y GST.

Aunque no se han determinado con precisión los mecanismos de acción de los distintos componentes del ACM sobre la regulación de los niveles de radicales libres celulares, es de gran relevancia la demostración de sus propiedades antioxidantes debido al importante rol que cumple el estrés oxidativo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

El estrés oxidativo promueve la activación de macrófagos y la aparición del proceso inflamatorio crónico característico del proceso aterosclerótico. El efecto antioxidante del ACM colaboraría en la inhibición de dicho proceso como ha sido reportado para otros AE (Haldar et al. 2012; Kummer et al. 2013; Khodabakhsh, Shafaroodi, and Asgarpanah 2015). Asimismo la actividad antioxidante del ACM en el torrente sanguíneo o compartimento vascular podría disminuir los niveles de oxidación de las LDL plasmáticas estrechamente asociadas con el inicio de la aterosclerosis (Barter 2005; Valenzuela et al. 2004; Steinberg 1997; Daugherty and Roselaar 1995). Se ha reportado que ciertos monoterpenos y AE son capaces de prevenir la oxidación de LDL con la consecuente reducción de uno de los factores de riesgo principales de la aterosclerosis (LDLox) y la atenuación de la enfermedad (Naderi et al. 2004).

Sin embargo, se cree que la oxidación de las LDL no tiene lugar en la circulación, y ocurre en la pared arterial (espacio subendotelial) debido a que las lipoproteínas séricas están bien protegidas de la oxidación por robustas defensas antioxidantes como la presencia de alfa-tocoferol, una vitamina antioxidante (Yoshida and Kisugi 2010). Por este motivo se podría hipotetizar que el ACM ingresaría unido a las LDL al espacio subendotelial o bien ingresaría directamente y se uniría allí a las LDL funcionando como un sistema antioxidante adicional al alfa-tocoferol, previniendo la oxidación producida por las ROS emitidas por distintos tipos

celulares (macrófagos, células endoteliales, células musculares lisas, etc).

Por otro lado, el estrés oxidativo puede contribuir a la iniciación, promoción y mantenimiento del desarrollo tumoral (Glasauer and Chandel 2014) y las propiedades antioxidantes de varios AE y monoterpenos (incluido el Li) han sido ampliamente asociadas con mecanismos de acción antitumorales (A. C. De Sousa et al. 2004; Akrouit et al. 2011; Lin et al. 2018; Yang et al. 2017).

Se reportó también que los AE de las hojas de *Pelargonium graveolens* (geranio) y de *Citrus reticulata* fueron capaces de eliminar radicales libres con las mismas concentraciones con las cuales inhibieron la viabilidad en dos líneas celulares de leucemia promielocítica humana (Fayed 2009). Estos reportes bibliográficos coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde el ACM demostró poseer actividad antioxidante a la vez que condujo a la inhibición de la viabilidad en varias líneas celulares, o a la reducción del crecimiento tumoral de células A549 implantadas en ratones nude.

El ACM demostró poseer capacidad antioxidante en todo el rango de concentraciones ensayadas. Sin embargo, si bien el efecto antioxidante de un compuesto se considera beneficioso ya que colabora con la eliminación de las ROS adquiriendo así propiedades quimiopreventivas, antiaterogénicas y antiinflamatorias, entre otras, también las ROS pueden resultar beneficiosas ya que inducen señales de muerte celular, senescencia y/o arresto celular (Glasauer and Chandel 2014) pudiendo utilizarse en terapias quimioterapéuticas. Por otro lado, dependiendo de las concentraciones utilizadas, algunos compuestos pueden inducir efectos antioxidantes o prooxidantes, por lo que la administración de antioxidantes debe ser previamente evaluada (dosis, frecuencia, etc) para lograr los objetivos deseados.

En función de los resultados obtenidos y la bibliografía reportada, se proponen dos mecanismos de acción antioxidante de los componentes del ACM en las células. Por un lado, actuarían como scavengers neutralizando radicales libres. Por otro lado, incrementarían la expresión génica de enzimas responsables de la homeostasis del estado redox celular, que se evidencia con el aumento de la actividad de las mismas.

En este contexto, el consumo de los antioxidantes a través de la dieta parece jugar un papel importante en la protección de las células y los tejidos contra el daño oxidativo y consecuentemente, en la prevención de varios eventos patológicos como son la aterosclerosis y el cáncer (Herrera et al. 2009; Kotecha, Takami, and Espinoza 2016).

# Capítulo VIII

## Conclusiones

### VIII.1. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se deducen las siguientes conclusiones:

- ❖ El ACM variedad Dancy contiene compuestos volátiles (monoterpenos) y no volátiles (carotenoides). Más del 90% de la fracción volátil corresponde al Li y el resto a distintos compuestos isoprenoides.
- ❖ Concentraciones del ACM que no inhiben la proliferación y/o viabilidad celular:
  - ✓ Disminuyen la síntesis de colesterol en células hepáticas (HepG2) mediante la inhibición en distintos puntos de la VM. A bajas concentraciones ( $<60 \mu\text{L/l}$ ), se sugiere la inhibición de enzimas río abajo del FPP, mientras que a altas concentraciones ( $\geq 60 \mu\text{L/l}$ ) se inhibirían las enzimas río arriba del mismo.
  - ✓ Disminuyen la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Acetato en DAG, TG y FL en las células hepáticas, sugiriendo la inhibición de la síntesis de estas especies lipídicas.
  - ✓ Reducen el contenido de los depósitos lipídicos en células espumosas (RAW 264.7).
- ❖ Concentraciones del ACM que inhiben la proliferación y/o viabilidad celular:
  - ✓ Ejercen mayor efecto inhibitorio en las líneas tumorales HepG2 y A549 (en un rango de  $113\text{-}176 \mu\text{L/L}$ ), que su componente mayoritario el Li (en un rango de  $157\text{-}195 \mu\text{L/L}$ ), lo que sugiere que la combinación de los distintos compuestos presentes en el ACM, generaría un efecto sinérgico o aditivo sobre la inhibición de la viabilidad celular.
  - ✓ En células A549 arrestan el ciclo celular en las fases G2/M y G0/G1, incrementan la ciclina B1, disminuyen la ciclina E (demostrando la inhibición del ciclo celular) e inducen apoptosis, sugiriendo que estos efectos serían los posibles mecanismos antiproliferativos.
  - ✓ Reducen el crecimiento tumoral de células A549 implantadas en ratones nude e inducen apoptosis en el tejido tumoral sin provocar toxicidad sistémica.
  - ✓ Disminuyen los niveles de proteínas Ras unida a membrana plasmática tumoral, sugiriendo que éste podría ser uno de los mecanismos moleculares por los cuales se inhibiría la proliferación celular y/o se desencadenaría la apoptosis.

## Conclusiones

---

- ❖ El ACM disminuye los niveles de peroxidación lipídica en LDL humanas y en células en cultivo e incrementa la actividad de las enzimas CAT, SOD y GST, demostrando así sus propiedades antioxidantes.

Las alteraciones en el metabolismo lipídico se han relacionado tradicionalmente con diversas patologías, como obesidad y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, estudios recientes han revelado que estas disfunciones también juegan un papel importante en el proceso de la carcinogénesis. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos naturales que modulen el metabolismo lipídico, así como la comprensión de sus mecanismos de acción moleculares, resultan fundamentales para el avance en nuevas estrategias terapéuticas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y esquematizados en el modelo propuesto en la Figura VIII.1 contribuyen a un mayor entendimiento de los mecanismos mediante los cuales el ACM actúa sobre el metabolismo lipídico ejerciendo sus efectos hipolipogénico, antioxidante y antiproliferativo, evidenciando su potencial terapéutico para el tratamiento de dislipemias, aterosclerosis o cáncer.

## Conclusiones

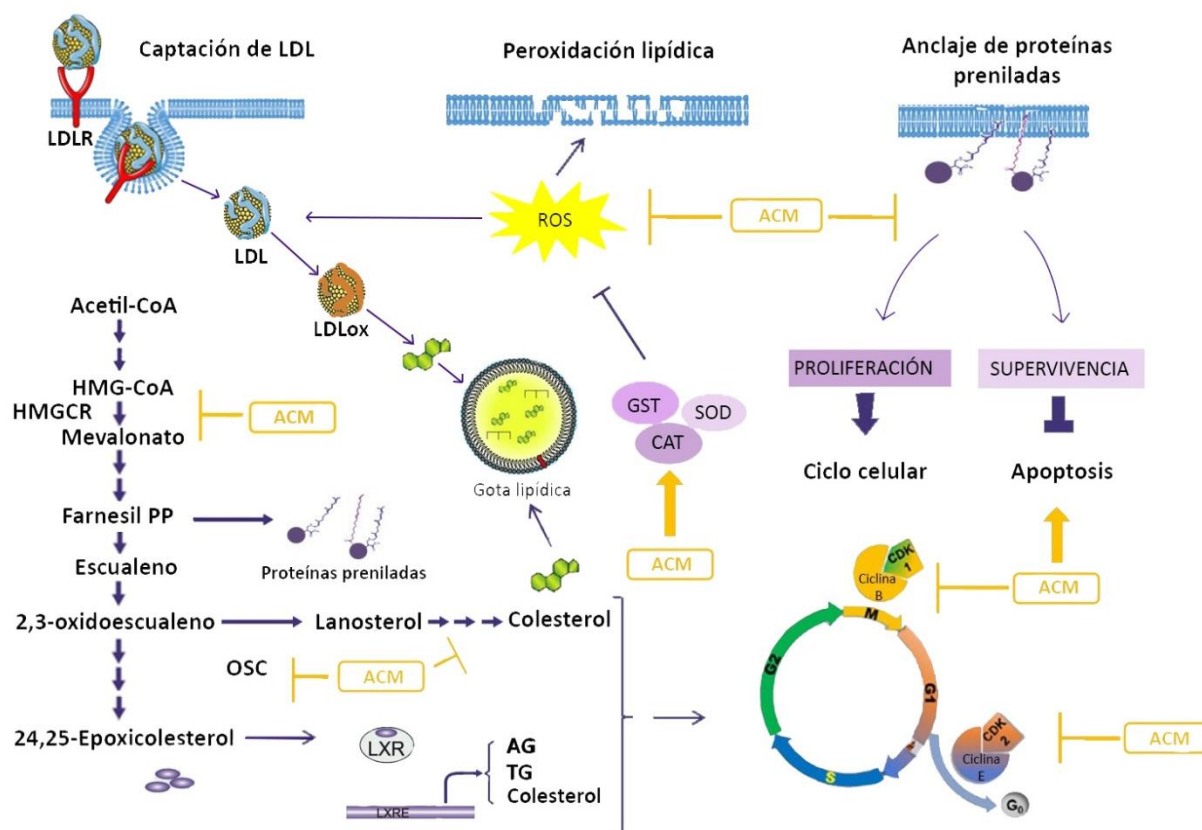


Figura VII.1. Modelo propuesto para los mecanismos de acción del aceite de cáscara de mandarina (ACM) sobre el metabolismo lipídico y proliferación celular. Abreviaturas. AG: ácidos grasos; CAT: catalasa; Cdk: quinasa dependientes de ciclina; GST: glutatión S-transferasa; HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; LDL: lipoproteínas de alta densidad; LDLox, lipoproteínas de alta densidad oxidadas; LDLR: receptor de lipoproteínas de alta densidad; LXR: receptor X hepático; OSC: 2,3-oxidoesqualeno: lanosterol ciclasa; ROS: especies reactivas del oxígeno; SOD: superóxido dismutasa; TG: triacilglicéridos.



# Capítulo IX

## Referencias

### IX.1. Referencias

- Abeyá Gilardon, Enrique O. 2005. "De Karelia a Jovita y Rosario En Argentina." *Archivos Argentinos de Pediatría* 103 (4): 291–92.
- Adams, Robert P, and O David Sparkman. 2007. "Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 18: 803–6.
- Aebi, Hugo. 1984. "[13] Catalase in Vitro." In *Methods in Enzymology*, 105:121–26. Elsevier.
- Afshordel, Sarah, Beatrice Kern, Jasmin Clasohm, Hildegard König, Maike Priester, Jakob Weissenberger, Donat Kögel, and Gunter P Eckert. 2015. "Lovastatin and Perillyl Alcohol Inhibit Glioma Cell Invasion, Migration, and Proliferation—Impact of Ras-/Rho-Prenylation." *Pharmacological Research* 91: 69–77.
- Agnoli, Claudia, Sara Grioni, Sabina Sieri, Carlotta Sacerdote, Paolo Vineis, Rosario Tumino, Maria Concetta Giurdanella, Valeria Pala, Amalia Mattiello, and Paolo Chiodini. 2014. "Colorectal Cancer Risk and Dyslipidemia: A Case-cohort Study Nested in an Italian Multicentre Cohort." *Cancer Epidemiology* 38 (2): 144–51.
- Agócs, Attila, Veronika Nagy, Zoltán Szabó, László Márk, Róbert Ohmacht, and József Deli. 2007. "Comparative Study on the Carotenoid Composition of the Peel and the Pulp of Different Citrus Species." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8 (3): 390–94.
- Ajewole, Kola, and A Adeyeye. 1993. "Characterisation of Nigerian Citrus Seed Oils." *Food Chemistry* 47 (1): 77–78.
- Akrout, Ahmed, Lidia Alarcon Gonzalez, Hajer El Jani, and Pablo Campra Madrid. 2011. "Antioxidant and Antitumor Activities of Artemisia Campestris and Thymelaea Hirsuta from Southern Tunisia." *Food and Chemical Toxicology* 49 (2): 342–47.
- Alberts, Bruce. 2016. *Biología Molecular de La Célula*. Sexta Edic. Ediciones Omega, S.A.
- Alemáan, C L, R M Más, I Rodeiro, M Noa, C Hernández, R Menéndez, and R Gámez. 1998. "Reference Database of the Main Physiological Parameters in Sprague-Dawley Rats from 6 to 32 Months." *Laboratory Animals* 32 (4): 457–66.
- Alquézar, Berta, María Jesús Rodrigo, and Lorenzo Zacarías. 2008. "Carotenoid Biosynthesis and Their Regulation in Citrus Fruits." *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2 (1): 23–37.
- ALTwaIRGI, AbduLLAH K. 2015. "Statins Are Potential Anticancerous Agents." *Oncology Reports* 33 (3): 1019–39.
- Amorati, Riccardo, Mario C Foti, and Luca Valgimigli. 2013. "Antioxidant Activity of Essential Oils." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (46): 10835–47.

## Referencias

---

- Arya, Nikhilesh, Mangesh D Kharjul, Chamanlal J Shishoo, Vishnu N Thakare, and Kishor S Jain. 2014. "Some Molecular Targets for Antihyperlipidemic Drug Research." *European Journal of Medicinal Chemistry* 85: 535–68.
- ATCC. 2018. "https://www.atcc.org/." 2018. <https://www.atcc.org/>.
- Ausloos, P, C L Clifton, S G Lias, A I Mikaya, Stephen E Stein, Dmitrii V Tchekhovskoi, O D Sparkman, V Zaikin, and Damo Zhu. 1999. "The Critical Evaluation of a Comprehensive Mass Spectral Library." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10 (4): 287–99.
- Baenke, Franziska, Barrie Peck, Heike Miess, and Almut Schulze. 2013. "Hooked on Fat: The Role of Lipid Synthesis in Cancer Metabolism and Tumour Development." *Disease Models & Mechanisms* 6 (6): 1353–63.
- Bahmani, Mahmoud, Mahmoud Mirhoseini, Hedayatollah Shirzad, Mehrnoosh Sedighi, Nejme Shahinfard, and Mahmoud Rafieian-Kopaei. 2015. "A Review on Promising Natural Agents Effective on Hyperlipidemia." *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 20 (3): 228–38.
- Bakkali, Fadil, Simone Averbeck, Dietrich Averbeck, and Mouhamed Idaomar. 2008. "Biological Effects of Essential Oils—a Review." *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446–75.
- Bandoni, Arnaldo L. 2003. "Los Recursos Vegetales Aromáticos En Latinoamérica. Su Aprovechamiento Industrial Para La Producción de Aromas y Sabores.." *Ciencia y tecnología para el Desarrollo. Subograma IV. Biomasa como fuente ....*
- Bar-Sagi, Dafna, and Alan Hall. 2000. "Ras and Rho GTPases: A Family Reunion." *Cell* 103 (2): 227–38.
- Bardon, Sylvie, Karine Picard, and Paule Martel. 1998. "Monoterpenes Inhibit Cell Growth, Cell Cycle Progression, and Cyclin D1 Gene Expression in Human Breast Cancer Cell Lines."
- Barter, Philip. 2005. "The Inflammation: Lipoprotein Cycle." *Atherosclerosis Supplements* 6 (2): 15–20.
- Baser, K Husnu Can, and Gerhard Buchbauer. 2015. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC press.
- Bayala, Bagora, Imaël H N Bassole, Riccardo Scifo, Charlemagne Gnoula, Laurent Morel, Jean-Marc A Lobaccaro, and Jacques Simporé. 2014. "Anticancer Activity of Essential Oils and Their Chemical Components—a Review." *American Journal of Cancer Research* 4 (6): 591.
- Bentinger, Magnus, Michael Tekle, and Gustav Dallner. 2010. "Coenzyme Q—biosynthesis and Functions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396 (1): 74–79.
- Berndt, Norbert, Andrew D Hamilton, and Saïd M Sebt. 2011. "Targeting Protein Prenylation for Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer* 11 (11): 775.
- Biacs, Peter A, and Hussein G Daood. 1994. "High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode-

## Referencias

---

- Array Detection of Carotenoids and Carotinoid Esters in Fruits and Vegetables.” *Journal of Plant Physiology* 143 (4–5): 520–25.
- Bicas, J L, I A Neri-Numa, ALTG Ruiz, J E De Carvalho, and G M Pastore. 2011. “Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Potential of Bioflavors.” *Food and Chemical Toxicology* 49 (7): 1610–15.
- Bjorkhem, Ingemar, and Ulf Diczfalusy. 2004. “24 (S), 25-Epoxycholesterol—a Potential Friend.” *Am Heart Assoc.*
- Bloch, Konrad. 1965. *The Biological Synthesis of Cholesterol*. Nobel Foundation.
- Bolte, Melanie, Patrick Dieckhoff, Cindy Krause, Gerhard H Braus, and Stefan Irniger. 2003. “Synergistic Inhibition of APC/C by Glucose and Activated Ras Proteins Can Be Mediated by Each of the Tpk1–3 Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Microbiology* 149 (5): 1205–16.
- Bonetti, P O, L O Lerman, Claudio Napoli, and A Lerman. 2003. “Statin Effects beyond Lipid Lowering—are They Clinically Relevant?” *European Heart Journal* 24 (3): 225–48.
- Borenfreund, Ellen, and James A Puerer. 1985. “Toxicity Determined in Vitro by Morphological Alterations and Neutral Red Absorption.” *Toxicology Letters* 24 (2–3): 119–24.
- Bradford, Marion M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–54.
- Braun, Sandra, Keren Bitton-Worms, and Derek LeRoith. 2011. “The Link between the Metabolic Syndrome and Cancer.” *International Journal of Biological Sciences* 7 (7): 1003.
- Bredholt, Geir, Monica Mannelqvist, Ingunn M Stefansson, Even Birkeland, Trond Hellem Bø, Anne M Øyan, Jone Trovik, Karl-Henning Kalland, Inge Jonassen, and Helga B Salvesen. 2015. “Tumor Necrosis Is an Important Hallmark of Aggressive Endometrial Cancer and Associates with Hypoxia, Angiogenesis and Inflammation Responses.” *Oncotarget* 6 (37): 39676.
- Brown, Andrew J. 2009. “24 (S), 25-Epoxycholesterol: A Messenger for Cholesterol Homeostasis.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (4): 744–47.
- Brugts, J J, T Yetgin, S E Hoeks, A M Gotto, J Shepherd, R G J Westendorp, A J M De Craen, R H Knopp, H Nakamura, and P Ridker. 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.
- Brusselmans, Koen, Leen Timmermans, Tine Van de Sande, Paul P Van Veldhoven, Guimin Guan, Ishaiahu Shechter, Frank Claessens, Guido Verhoeven, and Johannes V Swinnen. 2007. “Squalene Synthase, a Determinant of Raft-Associated Cholesterol and Modulator of Cancer Cell Proliferation.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (26): 18777–85.

## Referencias

---

- Bryan, B A, and P A d'Amore. 2007. "What Tangled Webs They Weave: Rho-GTPase Control of Angiogenesis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (16): 2053–65.
- Buchbaure, G. 2000. "The Detailed Analysis of Essential Oils Leads to the Understanding of Their Properties." *Perfum Flav* 25: 64–87.
- Buettner, Andrea, Montse Mestres, Anja Fischer, Josep Guasch, and Peter Schieberle. 2003. "Evaluation of the Most Odour-Active Compounds in the Peel Oil of Clementines (Citrus Reticulata Blanco Cv. Clementine)." *European Food Research and Technology* 216 (1): 11–14.
- Buhaescu, Irina, and Hassane Izzedine. 2007. "Mevalonate Pathway: A Review of Clinical and Therapeutical Implications." *Clinical Biochemistry* 40 (9–10): 575–84.
- Burri, Betty J. 2015. "Beta-cryptoxanthin as a Source of Vitamin A." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (9): 1786–94.
- Burt, Sara. 2004. "Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review." *International Journal of Food Microbiology* 94 (3): 223–53.
- Cano, Carlos, Pablo Bonilla, Mirtha Roque, and Julio Ruiz. 2008. "Actividad Antimicótica in Vitro y Metabolitos Del Aceite Esencial de Las Hojas de Minthostachys Mollis (Muña)." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 25 (3): 298–301.
- Cao, Ai-Li, Qing-Feng Tang, Wen-Chao Zhou, Yan-Yan Qiu, Song-Jiao Hu, and Pei-Hao Yin. 2015. "Ras/ERK Signaling Pathway Is Involved in Curcumin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Gastric Carcinoma AGS Cells." *Journal of Asian Natural Products Research* 17 (1): 56–63.
- Cao, Jingsong, Jian-Liang Li, Dongmei Li, James F Tobin, and Ruth E Gimeno. 2006. "Molecular Identification of Microsomal Acyl-CoA: Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, a Key Enzyme in de Novo Triacylglycerol Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (52): 19695–700.
- Cao, Jingsong, Sylvie Perez, Bryan Goodwin, Qingcong Lin, Haibing Peng, Ariful Qadri, Yingjiang Zhou, Ronald W Clark, Mylene Perreault, and James F Tobin. 2014. "Mice Deleted for GPAT3 Have Reduced GPAT Activity in White Adipose Tissue and Altered Energy and Cholesterol Homeostasis in Diet-Induced Obesity." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 306 (10): E1176–87.
- Castellano, Esther, and Julian Downward. 2011. "RAS Interaction with PI3K: More than Just Another Effector Pathway." *Genes & Cancer* 2 (3): 261–74.
- Chang, Ta-Yuan, Catherine C Y Chang, Nobutaka Ohgami, and Yoshio Yamauchi. 2006. "Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 129–57.
- Chaudhary, S C, M S Siddiqui, M Athar, and M Sarwar Alam. 2012. "D-Limonene Modulates

## Referencias

---

- Inflammation, Oxidative Stress and Ras-ERK Pathway to Inhibit Murine Skin Tumorigenesis." *Human & Experimental Toxicology* 31 (8): 798–811.
- Chaudhary, Sandeep Chand, Mohammad Saeed Siddiqui, Mohammad Athar, and Mohammad Sarwar Alam. 2013. "Geraniol Inhibits Murine Skin Tumorigenesis by Modulating COX-2 Expression, Ras-ERK1/2 Signaling Pathway and Apoptosis." *Journal of Applied Toxicology* 33 (8): 828–37.
- Chen, Gu, Hong Wang, Xu Zhang, and Shang-Tian Yang. 2014. "Nutraceuticals and Functional Foods in the Management of Hyperlipidemia." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54 (9): 1180–1201.
- Chen, Thomas C, Clovis O Da Fonseca, and Axel H Schönthal. 2015. "Preclinical Development and Clinical Use of Perillyl Alcohol for Chemoprevention and Cancer Therapy." *American Journal of Cancer Research* 5 (5): 1580.
- Chisholm, Mary G, Jason A Jell, and Dean M Cass Jr. 2003. "Characterization of the Major Odorants Found in the Peel Oil of Citrus Reticulata Blanco Cv. Clementine Using Gas Chromatography–olfactometry." *Flavour and Fragrance Journal* 18 (4): 275–81.
- Chou, Jui-Yi, Shin-Yu Lai, Shiow-Lin Pan, Guey-Mei Jow, Ji-Wang Chern, and Jih-Hwa Guh. 2003. "Investigation of Anticancer Mechanism of Thiadiazole-Based Compound in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells." *Biochemical Pharmacology* 66 (1): 115–24.
- Chow, C, N Wong, M Pagano, S W M Lun, K I Nakayama, K Nakayama, and K W Lo. 2012. "Regulation of APC/C Cdc20 Activity by RASSF1A–APC/C Cdc20 Circuitry." *Oncogene* 31 (15): 1975.
- Chutia, M, P Deka Bhuyan, M G Pathak, T C Sarma, and P Boruah. 2009. "Antifungal Activity and Chemical Composition of Citrus Reticulata Blanco Essential Oil against Phytopathogens from North East India." *LWT-Food Science and Technology* 42 (3): 777–80.
- Clegg, Richard J, Bruce Middleton, G Duncan Bell, and David A White. 1980. "Inhibition of Hepatic Cholesterol Synthesis and S-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase by Mono and Bicyclic Monoterpenes Administered in Vivo." *Biochemical Pharmacology* 29 (15): 2125–27.
- Cohen, Gerald M, Xiao-Ming Sun, Howard Fearnhead, Marion MacFarlane, David G Brown, Roger T Snowden, and David Dinsdale. 1994. "Formation of Large Molecular Weight Fragments of DNA Is a Key Committed Step of Apoptosis in Thymocytes." *The Journal of Immunology* 153 (2): 507–16.
- Cortes, Victor A, Dolores Busso, Pablo Mardones, Alberto Maiz, Antonio Arteaga, Flavio Nervi, and Attilio Rigotti. 2013. "Retracted: Advances in the Physiological and Pathological Implications of Cholesterol." *Biological Reviews* 88 (4): 825–43.
- Cortés, Víctor, Nicolás Quezada, Attilio Rigotti, and Alberto Maiz. 2005. "Nuevos Receptores Nucleares Heterodiméricos: Reguladores Metabólicos Con Impacto En Fisiopatología y Su Proyección

## Referencias

---

- Terapéutica En Dislipidemias y Diabetes Mellitus." *Revista Médica de Chile* 133 (12): 1483–92.
- Crespo, Rosana, Sandra Montero Villegas, Martín C Abba, Margarita G de Bravo, and Mónica P Polo. 2012. "Transcriptional and Posttranscriptional Inhibition of HMGCR and PC Biosynthesis by Geraniol in 2 Hep-G2 Cell Proliferation Linked Pathways." *Biochemistry and Cell Biology* 91 (3): 131–39.
- Crowell, Pamela L, Rebekah R Chang, Z B Ren, Charles E Elson, and Michael N Gould. 1991. "Selective Inhibition of Isoprenylation of 21-26-KDa Proteins by the Anticarcinogen d-Limonene and Its Metabolites." *Journal of Biological Chemistry* 266 (26): 17679–85.
- Cruz, Pedro Miguel, Huanbiao Mo, Walter McConathy, Nirupama Avinash Sabnis, and Andras G Lacko. 2013. "The Role of Cholesterol Metabolism and Cholesterol Transport in Carcinogenesis: A Review of Scientific Findings, Relevant to Future Cancer Therapeutics." *Frontiers in Pharmacology* 4: 119.
- Cuello, Mauricio, Sumie Kato, Daniela Díaz, and Gareth Owen. 2013. "Efectos de Las Estatinas En Cáncer:¿ Potencial Rol En Terapéutica y Prevención?" *Revista Médica de Chile* 141 (2): 227–36.
- Dallner, Gustav, and Pavel J Sindelar. 2000. "Regulation of Ubiquinone Metabolism." *Free Radical Biology and Medicine* 29 (3–4): 285–94.
- Daugherty, Alan, and Simon E Roselaar. 1995. "Lipoprotein Oxidation as a Mediator of Atherogenesis: Insights from Pharmacological Studies." *Cardiovascular Research* 29 (3): 297–311.
- Desvergne, Béatrice, Liliane Michalik, and Walter Wahli. 2006. "Transcriptional Regulation of Metabolism." *Physiological Reviews* 86 (2): 465–514.
- Dewick, P M. 2002. "The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids. Medicinal Natural Products." Wiley, New York.
- Dirección de Estadísticas e Información de Salud. 2016. "Http://Www.Deis.Msal.Gov.Ar." 2016. <http://www.deis.msal.gov.ar>.
- Dorman, H J Damien, Peter Surai, and Stanley G Deans. 2000. "In Vitro Antioxidant Activity of a Number of Plant Essential Oils and Phytoconstituents." *Journal of Essential Oil Research* 12 (2): 241–48.
- Dugo, P, M Herrero, T Kumm, D Giuffrida, G Dugo, and L Mondello. 2008. "Comprehensive Normal-Phase× Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection for the Analysis of Free Carotenoids and Carotenoid Esters from Mandarin." *Journal of Chromatography A* 1189 (1–2): 196–206.
- Duncan, Robin E, Dominic Lau, Ahmed El-Sohemy, and Michael C Archer. 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." *Biochemical Pharmacology* 68 (9): 1739–47.
- Eberle, Delphine, Bronwyn Hegarty, Pascale Bossard, Pascal Ferré, and Fabienne Fougère. 2004. "SREBP

## Referencias

---

- Transcription Factors: Master Regulators of Lipid Homeostasis." *Biochimie* 86 (11): 839–48.
- Edris, Amr E. 2007. "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review." *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 21 (4): 308–23.
- Edwards, Peter A, and Johan Ericsson. 1999. "Sterols and Isoprenoids: Signaling Molecules Derived from the Cholesterol Biosynthetic Pathway." *Annual Review of Biochemistry* 68 (1): 157–85.
- El-Agamey, Ali, Gordon M Lowe, David J McGarvey, Alan Mortensen, Denise M Phillip, T George Truscott, and Andrew J Young. 2004. "Carotenoid Radical Chemistry and Antioxidant/pro-Oxidant Properties." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430 (1): 37–48.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495–516.
- Espenshade, Peter J, and Adam L Hughes. 2007. "Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes." *Annu. Rev. Genet.* 41: 401–27.
- Etienne-Manneville, Sandrine, and Alan Hall. 2002. "Rho GTPases in Cell Biology." *Nature* 420 (6916): 629.
- Fayed, Sayed A. 2009. "Antioxidant and Anticancer Activities of Citrus Reticulate (Petitgrain Mandarin) and Pelargonium Graveolens (Geranium) Essential Oils." *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5 (5): 740–47.
- Federcitrus. 2018. "El Cultivo de La 'Madarina' (Citrus Reticulata) En Argentina." 2018. <https://www.federcitrus.org/>.
- Feingold, Kenneth R, Judy K Shigenaga, Mahmood R Kazemi, Carol M McDonald, Sophie M Patzek, Andrew S Cross, Arthur Moser, and Carl Grunfeld. 2012. "Mechanisms of Triglyceride Accumulation in Activated Macrophages." *Journal of Leukocyte Biology* 92 (4): 829–39.
- Fiedor, Joanna, and Květoslava Burda. 2014. "Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease." *Nutrients* 6 (2): 466–88.
- Figueiredo, A Cristina, José G Barroso, Luis G Pedro, and Johannes J C Scheffer. 2008. "Factors Affecting Secondary Metabolite Production in Plants: Volatile Components and Essential Oils." *Flavour and Fragrance Journal* 23 (4): 213–26.
- Foster, Kimberly A, Christine G Oster, Mary M Mayer, Michael L Avery, and Kenneth L Audus. 1998. "Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism." *Experimental Cell Research* 243 (2): 359–66.
- Fu, HongFei, BiJun Xie, Gang Fan, ShaoJun Ma, XinRong Zhu, and SiYi Pan. 2010. "Effect of Esterification with Fatty Acid of  $\beta$ -Cryptoxanthin on Its Thermal Stability and Antioxidant Activity by



## Referencias

---

- Chemiluminescence Method." *Food Chemistry* 122 (3): 602–9.
- Galle, Marianela, Rosana Crespo, Boris Rodenak Kladniew, Sandra Montero Villegas, Mónica Polo, and Margarita G de Bravo. 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." *Nutrition and Cancer* 66 (5): 888–95.
- Galle, Marianela, Boris Rodenak Kladniew, María Agustina Castro, Sandra Montero Villegas, Ezequiel Lacunza, Mónica Polo, Margarita García de Bravo, and Rosana Crespo. 2015. "Modulation by Geraniol of Gene Expression Involved in Lipid Metabolism Leading to a Reduction of Serum-Cholesterol and Triglyceride Levels." *Phytomedicine* 22 (7–8): 696–704.
- Ghatak, Piya Das, and Chandan K Sen. 2016. "20 Antioxidant Additives in Food Preservation and Human Health." *Food Toxicology*, 377.
- Giard, Donald J, Stuart A Aaronson, George J Todaro, Paul Arnstein, John H Kersey, Harvey Dosik, and Wade P Parks. 1973. "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors." *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1417–23.
- Glasauer, Andrea, and Navdeep S Chandel. 2014. "Targeting Antioxidants for Cancer Therapy." *Biochemical Pharmacology* 92 (1): 90–101.
- Goedeke, Leigh, and Carlos Fernández-Hernando. 2012. "Regulation of Cholesterol Homeostasis." *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (6): 915–30.
- Goldstein, Joseph L, and Michael S Brown. 1990. "Regulation of the Mevalonate Pathway." *Nature* 343 (6257): 425.
- Goldstein, Larry B, Robert Adams, Mark J Alberts, Lawrence J Appel, Lawrence M Brass, Cheryl D Bushnell, Antonio Culebras, Thomas J DeGraba, Philip B Gorelick, and John R Guyton. 2006. "Primary Prevention of Ischemic Stroke: A Guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: Cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council." *Stroke* 37 (6): 1583–1633.
- Gonzalez-Burgos, E, and M P Gomez-Serranillos. 2012. "Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity." *Current Medicinal Chemistry* 19 (31): 5319–41.
- Goto, Tsuyoshi, Young-Il Kim, Nobuyuki Takahashi, and Teruo Kawada. 2013. "Natural Compounds Regulate Energy Metabolism by the Modulating the Activity of Lipid-sensing Nuclear Receptors." *Molecular Nutrition & Food Research* 57 (1): 20–33.
- Gough, Doreen P, and F W Hemming. 1970. "The Characterization and Stereochemistry of Biosynthesis of Dolichols in Rat Liver." *Biochemical Journal* 118 (1): 163–66.

## Referencias

---

- Grønning-Wang, Line M, Christian Bindsbøll, and Hilde I Nebb. 2013. "The Role of Liver X Receptor in Hepatic de Novo Lipogenesis and Cross-Talk with Insulin and Glucose Signaling." In *Lipid Metabolism*. InTech.
- Group, Scandinavian Simvastatin Survival Study. 1994. "Randomised Trial of Cholesterol Lowering in 4444 Patients with Coronary Heart Disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." *The Lancet* 344 (8934): 1383–89.
- Guideline, T T, and O Guideline. 2001. "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals." Oecd/Ocde.
- Guo, Yi, Kimberly R Cordes, Robert V Farese, and Tobias C Walther. 2009. "Lipid Droplets at a Glance." *J Cell Sci* 122 (6): 749–52.
- Gutierrez-Pajares, Jorge L, Céline Ben Hassen, Stéphan Chevalier, and Philippe G Frank. 2016. "SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer." *Frontiers in Pharmacology* 7: 338.
- Gysin, Stephan, Megan Salt, Amy Young, and Frank McCormick. 2011. "Therapeutic Strategies for Targeting Ras Proteins." *Genes & Cancer* 2 (3): 359–72.
- Habig, William H, Michael J Pabst, and William B Jakoby. 1974. "Glutathione S-Transferases the First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation." *Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130–39.
- Haldar, Sagnik, Biswakanth Kar, Narayan Dolai, R B Suresh Kumar, Biswaranjan Behera, and Pallab Kanti Haldar. 2012. "In Vivo Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lippia Alba." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2: S667–70.
- Halliwell, Barry, and John M C Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74.
- Hansson, Göran K. 2005. "Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease." *New England Journal of Medicine* 352 (16): 1685–95.
- Hardcastle, IanR, MartinG Rowlands, Amelia Moreno Barber, RachelM Grimshaw, MukeshK Mohan, BernardP Nutley, and Michael Jarman. 1999. "Inhibition of Protein Prenylation by Metabolites of Limonene." *Biochemical Pharmacology* 57 (7): 801–9.
- Harwood, H J, I M Alvarez, W D Noyes, and P W Stacpoole. 1991. "In Vivo Regulation of Human Leukocyte 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase: Increased Enzyme Protein Concentration and Catalytic Efficiency in Human Leukemia and Lymphoma." *Journal of Lipid Research* 32 (8): 1237–52.
- Herrera, Emilio, Rafael Jiménez, Okezie I Aruoma, Serge Hercberg, Isidro Sánchez-García, and César

## Referencias

---

- Fraga. 2009. "Aspects of Antioxidant Foods and Supplements in Health and Disease." *Nutrition Reviews* 67: S140–44.
- Hinson, D D, K L Chambliss, M J Toth, R D Tanaka, and K M Gibson. 1997. "Post-Translational Regulation of Mevalonate Kinase by Intermediates of the Cholesterol and Nonsterol Isoprene Biosynthetic Pathways." *Journal of Lipid Research* 38 (11): 2216–23.
- Hoang, Minh-Hien, Yaoyao Jia, Hee-jin Jun, Ji-Hae Lee, Dong-Ho Lee, Bang-Yeon Hwang, Woo-Jin Kim, Hak-Ju Lee, and Sung-Joon Lee. 2012. "Ethyl 2, 4, 6-Trihydroxybenzoate Is an Agonistic Ligand for Liver X Receptor That Induces Cholesterol Efflux from Macrophages without Affecting Lipid Accumulation in HepG2 Cells." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (12): 4094–99.
- Holstein, Sarah A, and Raymond J Hohl. 2004. "Isoprenoids: Remarkable Diversity of Form and Function." *Lipids* 39 (4): 293–309.
- Hsu, Ya-Ling, Po-Lin Kuo, and Chun-Ching Lin. 2004. "Proliferative Inhibition, Cell-Cycle Dysregulation, and Induction of Apoptosis by Ursolic Acid in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells." *Life Sciences* 75 (19): 2303–16.
- Huang, Chunfa, and Carl Freter. 2015. "Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 16 (1): 924–49.
- Hüsnü, K, Can Başer, and Fatih Demirci. 2007. "Chemistry of Essential Oils." In *Flavours and Fragrances*, 43–86. Springer.
- Ikonen, Elina. 2006. "Mechanisms for Cellular Cholesterol Transport: Defects and Human Disease." *Physiological Reviews* 86 (4): 1237–61.
- Janowski, Bethany A, Michael J Grogan, Stacey A Jones, G Bruce Wisely, Steven A Kliewer, Elias J Corey, and David J Mangelsdorf. 1999. "Structural Requirements of Ligands for the Oxysterol Liver X Receptors LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1): 266–71.
- Javitt, NORMAN B. 1990. "Hep G2 Cells as a Resource for Metabolic Studies: Lipoprotein, Cholesterol, and Bile Acids." *The FASEB Journal* 4 (2): 161–68.
- Jayaprakasha, Guddadarangavvanahally K, Pradeep S Negi, Sagarika Sikder, Lingamallu Jagan Mohanrao, and Kurian K Sakariah. 2000. "Antibacterial Activity of Citrus Reticulata Peel Extracts." *Zeitschrift Für Naturforschung C* 55 (11–12): 1030–34.
- Jia, Shu-Sheng, Guang-Peng Xi, Ming Zhang, Yan-Bo Chen, Bo Lei, Xin-Shu Dong, and Yan-Mei Yang. 2013. "Induction of Apoptosis by D-Limonene Is Mediated by Inactivation of Akt in LS174T Human Colon Cancer Cells." *Oncology Reports* 29 (1): 349–54.
- Jiang, P, R Mukthavaram, Y Chao, N Nomura, I S Bharati, V Fogal, S Pastorino, D Teng, X Cong, and S C Pingle. 2014. "In Vitro and in Vivo Anticancer Effects of Mevalonate Pathway Modulation on Human

## Referencias

---

- Cancer Cells.” *British Journal of Cancer* 111 (8): 1562.
- Jun, Hee-jin, Minh-Hien Hoang, Siok-Koon Yeo, Yaoyao Jia, and Sung-Joon Lee. 2013. “Induction of ABCA1 and ABCG1 Expression by the Liver X Receptor Modulator Cineole in Macrophages.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (2): 579–83.
- Kaminsky, Yury G, and Elena A Kosenko. 2010. “Molecular Mechanisms of Toxicity of Simvastatin, Widely Used Cholesterol-Lowering Drug. A Review.” *Central European Journal of Medicine* 5 (3): 269–79.
- Kawata, Sumio, Kenji Takaishi, Toshihiko Nagase, Nobuyuki Ito, Yukihiko Matsuda, Shinji Tamura, Yuji Matsuzawa, and Seiichiro Tarui. 1990. “Increase in the Active Form of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Human Hepatocellular Carcinoma: Possible Mechanism for Alteration of Cholesterol Biosynthesis.” *Cancer Research* 50 (11): 3270–73.
- Kennedy, Eugene P. 1961. “Biosynthesis of Complex Lipids.” In *Fed. Proc.*, 20:934–40.
- Kerr, John F R, Andrew H Wyllie, and Alastair R Currie. 1972. “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics.” *British Journal of Cancer* 26 (4): 239.
- Khatun, Irani, Ronald W Clark, Nicholas B Vera, Kou Kou, Derek M Erion, Timothy Coskran, Walter F Bobrowski, Carlin Okerberg, and Bryan Goodwin. 2016. “Characterization of a Novel Intestinal Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Pathway and Its Role in Lipid Homeostasis.” *Journal of Biological Chemistry* 291 (6): 2602–15.
- Khodabakhsh, Pariya, Hamed Shafaroodi, and Jinous Asgarpanah. 2015. “Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Citrus Aurantium L. Blossoms Essential Oil (Neroli): Involvement of the Nitric Oxide/Cyclic-Guanosine Monophosphate Pathway.” *Journal of Natural Medicines* 69 (3): 324–31.
- Kladniew, Boris Rodenak, Mónica Polo, Sandra Montero Villegas, Marianela Galle, Rosana Crespo, and Margarita García de Bravo. 2014. “Synergistic Antiproliferative and Anticholesterogenic Effects of Linalool, 1, 8-Cineole, and Simvastatin on Human Cell Lines.” *Chemico-Biological Interactions* 214: 57–68.
- Knowles, Barbara B, Chin C Howe, and David P Aden. 1980. “Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen.” *Science* 209 (4455): 497–99.
- Kotani, Shuji, Stuart Tugendreich, Mika Fujii, Pia-Marie Jorgensen, Nobumoto Watanabe, Christer Hoog, Philip Hieter, and Kazuo Todokoro. 1998. “PKA and MPF-Activated Polo-like Kinase Regulate Anaphase-Promoting Complex Activity and Mitosis Progression.” *Molecular Cell* 1 (3): 371–80.
- Kotecha, Ritesh, Akiyoshi Takami, and J Luis Espinoza. 2016. “Dietary Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: A Review of the Clinical Evidence.” *Oncotarget* 7 (32): 52517.
- Kovats, E Sz. 1965. “Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index

- System." *Adv. Chromatogr.* 1: 229–47.
- Krinsky, Norman I, and Elizabeth J Johnson. 2005. "Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease." *Molecular Aspects of Medicine* 26 (6): 459–516.
- Kubatka, Peter, Peter Kruzliak, Vladimir Rotrekl, Sarka Jelinkova, and Beata Mladosevicova. 2014. "Statins in Oncological Research: From Experimental Studies to Clinical Practice." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 92 (3): 296–311.
- Kummer, Raquel, Fernanda Carolina Fachini-Queiroz, Camila Fernanda Estevão-Silva, Renata Grespan, Expedito Leite Silva, Ciomar Aparecida Bersani-Amado, and Roberto Kenji Nakamura Cuman. 2013. "Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrus Latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Kunjathoor, Vidya V, Maria Febbraio, Eugene A Podrez, Kathryn J Moore, Lorna Andersson, Stephanie Koehn, Jeongmi S Rhee, Roy Silverstein, Henry F Hoff, and Mason W Freeman. 2002. "Scavenger Receptors Class AI/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages." *Journal of Biological Chemistry*.
- Künzl, Martin, Christine Wasinger, and Martin Hohenegger. 2013. "WJP." *World* 2 (4): 100–106.
- Kuzu, Omer F, Mohammad A Noory, and Gavin P Robertson. 2016. "The Role of Cholesterol in Cancer." *Cancer Research* 76 (8): 2063–70.
- Kwiterovich Jr, Peter O. 2000. "The Metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides: A Current Review." *The American Journal of Cardiology* 86 (12): 5–10.
- Lambert, Gilles, Barbara Sjouke, Benjamin Choque, John J P Kastelein, and G Kees Hovingh. 2012. "The PCSK9 Decade." *Journal of Lipid Research*, jlr-R026658.
- Lanas, Fernando, Alvaro Avezum, Leonelo E Bautista, Rafael Diaz, Max Luna, Shofiqul Islam, and Salim Yusuf. 2007. "Risk Factors for Acute Myocardial Infarction in Latin America: The INTERHEART Latin American Study." *Circulation* 115 (9): 1067–74.
- Li, Na, Hanjiang Fu, Yi Tie, Zheng Hu, Wei Kong, Yongge Wu, and Xiaofei Zheng. 2009. "MiR-34a Inhibits Migration and Invasion by down-Regulation of c-Met Expression in Human Hepatocellular Carcinoma Cells." *Cancer Letters* 275 (1): 44–53.
- Li, Ying Chun, Mi Jung Park, Sang-Kyu Ye, Chul-Woo Kim, and Yong-Nyun Kim. 2006. "Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents." *The American Journal of Pathology* 168 (4): 1107–18.
- Lichtenthaler, Hartmut K. 1999. "The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants." *Annual Review of Plant Biology* 50 (1): 47–65.

## Referencias

---

- Likus, Wirginia, Krzysztof Siemianowicz, Konrad Bieńk, Małgorzata Pakuła, Himani Pathak, Chhanda Dutta, Qiong Wang, Shahla Shojaei, Yehuda G Assaraf, and Saeid Ghavami. 2016. "Could Drugs Inhibiting the Mevalonate Pathway Also Target Cancer Stem Cells?" *Drug Resistance Updates* 25: 13–25.
- Lim, Shuhui, and Philipp Kaldis. 2013. "Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation." *Development* 140 (15): 3079–93.
- Lin, Jing, Qiao-yan Cai, Wen Xu, Jiu-mao Lin, and Jun Peng. 2018. "Chemical Composition, Anticancer, Anti-Neuroinflammatory, and Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Patrinia Scabiosaefolia*." *Chinese Journal of Integrative Medicine* 24 (3): 207–12.
- Linstrom, Peter J, and W G Mallard. 2001. "NIST Chemistry Webbook; NIST Standard Reference Database No. 69."
- Long, Jia, Chan-Juan Zhang, Neng Zhu, Ke Du, Yu-Fang Yin, Xi Tan, Duan-Fang Liao, and Li Qin. 2018. "Lipid Metabolism and Carcinogenesis, Cancer Development." *American Journal of Cancer Research* 8 (5): 778.
- Lota, Marie-Laure, Dominique de Rocca Serra, Félix Tomi, and Joseph Casanova. 2000. "Chemical Variability of Peel and Leaf Essential Oils of Mandarins from *Citrus Reticulata* Blanco." *Biochemical Systematics and Ecology* 28 (1): 61–78.
- Lowry, Oliver H, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, and Rose J Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75.
- Lü, Jian-Ming, Peter H Lin, Qizhi Yao, and Changyi Chen. 2010. "Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (4): 840–60.
- Lu, Shaoyong, Hyunbum Jang, Shuo Gu, Jian Zhang, and Ruth Nussinov. 2016. "Drugging Ras GTPase: A Comprehensive Mechanistic and Signaling Structural View." *Chemical Society Reviews* 45 (18): 4929–52.
- Lusis, A.J. 2000. "Atherosclerosis." *Nature* 407: 233–41.
- Ma, Zhiqiang, Chao Deng, Wei Hu, Jie Zhou, Chongxi Fan, Shouyin Di, Dong Liu, Yang Yang, and Dongjin Wang. 2017. "Liver X Receptors and Their Agonists: Targeting for Cholesterol Homeostasis and Cardiovascular Diseases." *Curr Issues Mol Biol* 22: 41–64.
- Mahmoud, Ghada I. 2013. "Biological Effects, Antioxidant and Anticancer Activities of Marigold and Basil Essential Oils." *Journal of Medicinal Plants Research* 7 (10): 561–72.
- Mamede, Ana Catarina, Sónia Dorilde Tavares, Ana Margarida Abrantes, Joana Trindade, Jorge Manuel Maia, and Maria Filomena Botelho. 2011. "The Role of Vitamins in Cancer: A Review." *Nutrition and*

## Referencias

---

- Cancer* 63 (4): 479–94.
- Manassero, Carlos A, Juan R Girotti, Sergio Mijailovsky, Margarita García de Bravo, and Mónica Polo. 2013. “In Vitro Comparative Analysis of Antiproliferative Activity of Essential Oil from Mandarin Peel and Its Principal Component Limonene.” *Natural Product Research* 27 (16): 1475–78.
- Mander, Erin L, Roger T Dean, Keith K Stanley, and Wendy Jessup. 1994. “Apolipoprotein B of Oxidized LDL Accumulates in the Lysosomes of Macrophages.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1212 (1): 80–92.
- Manning, Dean D, Norman D Reed, and Charles F Shaffer. 1973. “Maintenance of Skin Xenografts of Widely Divergent Phylogenetic Origin on Congenitally Athymic (Nude) Mice.” *Journal of Experimental Medicine* 138 (2): 488–94.
- Mark, Michael, P Muller, Roland Maier, and Bernhard Eisele. 1996. “Effects of a Novel 2, 3-Oxidosqualene Cyclase Inhibitor on the Regulation of Cholesterol Biosynthesis in HepG2 Cells.” *Journal of Lipid Research* 37 (1): 148–58.
- Martin, Seamus J, and Douglas R Green. 1995. “Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts?” *Cell* 82 (3): 349–52.
- Martínez, J, B Sulbarán de Ferrer, G Ojeda de Rodríguez, A Ferrer, and R Nava. 2003. “Actividad Antibacteriana Del Aceite Esencial de Mandarina.” *Revista de La Facultad de Agronomía* 20 (4): 502–12.
- Mazumder, S, E L DuPree, and A Almasan. 2004. “A Dual Role of Cyclin E in Cell Proliferation and Apoptosis May Provide a Target for Cancer Therapy.” *Current Cancer Drug Targets* 4 (1): 65–75.
- Mazza, G, and Raymond Brouillard. 1987. “Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3, 5-Diglucoside and Four 3-Deoxyanthocyanins in Aqueous Solutions.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35 (3): 422–26.
- McAnally, Jennifer A, Jagriti Gupta, Shradha Sodhani, Lou Bravo, and Huanbiao Mo. 2007. “Tocotrienols Potentiate Lovastatin-Mediated Growth Suppression in Vitro and in Vivo.” *Experimental Biology and Medicine* 232 (4): 523–31.
- Meiyanto, Edy, Adam Hermawan, and Anindyajati Anindyajati. 2012. “Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13 (2): 427–36.
- Merajver, Sofia D, and Saad Z Usmani. 2005. “Multifaceted Role of Rho Proteins in Angiogenesis.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 10 (4): 291–98.
- Miller, Jessica A, Julie E Lang, Michelle Ley, Raymond B Nagle, Chiu-Hsieh Hsu, Patricia Thompson, Catherine Cordova, Amy Waer, and H H Sherry Chow. 2013. “Human Breast Tissue Disposition and



## Referencias

---

- Bioactivity of Limonene in Women with Early Stage Breast Cancer.” *Cancer Prevention Research*, canprevres-0452.
- Miller, Jessica A, Patricia A Thompson, Iman A Hakim, H-H Sherry Chow, and Cynthia A Thomson. 2011. “D-Limonene: A Bioactive Food Component from Citrus and Evidence for a Potential Role in Breast Cancer Prevention and Treatment.” *Oncology Reviews* 5 (1): 31–42.
- Miller, Nicholas J, Julia Sampson, Luis P Candeias, Peter M Bramley, and Catherine A Rice-Evans. 1996. “Antioxidant Activities of Carotenes and Xanthophylls.” *FEBS Letters* 384 (3): 240–42.
- Minella, Alex C, Markus Welcker, and Bruce E Clurman. 2005. “Ras Activity Regulates Cyclin E Degradation by the Fbw7 Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (27): 9649–54.
- Misra, Hara P, and Irwin Fridovich. 1972. “The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase.” *Journal of Biological Chemistry* 247 (10): 3170–75.
- Miziorko, Henry M. 2011. “Enzymes of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505 (2): 131–43.
- Mo, Huanbiao, and Charles E Elson. 2004. “Studies of the Isoprenoid-Mediated Inhibition of Mevalonate Synthesis Applied to Cancer Chemotherapy and Chemoprevention.” *Experimental Biology and Medicine* 229 (7): 567–85.
- Mohamed, Amal A, Gehan A El-Emary, and Hanaa F Ali. 2010. “Influence of Some Citrus Essential Oils on Cell Viability, Glutathione-S-Transferase and Lipid Peroxidation in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.” *Journal of American Science* 6 (10): 820–26.
- Montero-Villegas, Sandra, Mónica Polo, Marianela Galle, Boris Rodenak-Kladniew, María Castro, Ana Ves-Losada, Rosana Crespo, and Margarita García De Bravo. 2017. “Inhibition of Mevalonate Pathway and Synthesis of the Storage Lipids in Human Liver-Derived and Non-Liver Cell Lines by Lippia Alba Essential Oils.” *Lipids* 52 (1): 37–49.
- Moore, Kathryn J, and Ira Tabas. 2011. “Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis.” *Cell* 145 (3): 341–55.
- Mosmann, Tim. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63.
- Mullen, Peter J, Rosemary Yu, Joseph Longo, Michael C Archer, and Linda Z Penn. 2016. “The Interplay between Cell Signalling and the Mevalonate Pathway in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 16 (11): 718.
- Muñoz-Pinedo, Cristina, N El Mjiyad, and J E Ricci. 2013. “Cancer Metabolism: Current Perspectives and



## Referencias

---

- Future Directions." *Cell Death & Disease* 3 (1): e248.
- Murai, Toshiyuki. 2015. "Cholesterol Lowering: Role in Cancer Prevention and Treatment." *Biological Chemistry* 396 (1): 1–11.
- Naderi, Gholam Ali, Seddigheh Asgary, Mohsen Ani, Nizal Sarraf-Zadegan, and Mohammad Reza Safari. 2004. "Effect of Some Volatile Oils on the Affinity of Intact and Oxidized Low-Density Lipoproteins for Adrenal Cell Surface Receptors." *Molecular and Cellular Biochemistry* 267 (1–2): 59–66.
- Navarro, Virginia, A Zabala, S Gómez, and M Portillo. 2009. "Metabolismo Del Colesterol: Bases Actualizadas." *Rev Esp Obes* 7 (6): 360–84.
- Nguyen, Kathy C, William G Willmore, and Azam F Tayabali. 2013. "Cadmium Telluride Quantum Dots Cause Oxidative Stress Leading to Extrinsic and Intrinsic Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells." *Toxicology* 306: 114–23.
- Nishida, Kazuhiko, Osamu Yamaguchi, and Kinya Otsu. 2008. "Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Heart Disease." *Circulation Research* 103 (4): 343–51.
- Nishino, Hoyoku. 1998. "Cancer Prevention by Carotenoids." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402 (1): 159–63.
- Njoroge, Simon Muhoho, Hellen Njoki Mungai, Hiroshi Koaze, Nguyen Thi Lan Phi, and Masayoshi Sawamura. 2006. "Volatile Constituents of Mandarin (Citrus Reticulata Blanco) Peel Oil from Burundi." *Journal of Essential Oil Research* 18 (6): 659–62.
- Norbury, Chris, and Paul Nurse. 1992. "Animal Cell Cycles and Their Control." *Annual Review of Biochemistry* 61 (1): 441–68.
- Notas, George, Artemissia-Phoebe Nifli, Marilena Kampa, Joseph Vercauteren, Elias Kouroumalis, and Elias Castanas. 2006. "Resveratrol Exerts Its Antiproliferative Effect on HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cells, by Inducing Cell Cycle Arrest, and NOS Activation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1760 (11): 1657–66.
- Obeid, Lina M, Can Senkal, and Michael Pulkoski-Gross. 2017. "Novel Mechanisms of Regulation of Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology." *The FASEB Journal* 31 (1\_supplement): 523–27.
- Ohashi, R, H Mu, X Wang, Q Yao, and C Chen. 2005. "Reverse Cholesterol Transport and Cholesterol Efflux in Atherosclerosis." *Qjm* 98 (12): 845–56.
- Ohkawa, Hiroshi, Nobuko Ohishi, and K Yagi. 1978. "Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Thiobarbituric Acid." *Journal of Lipid Research* 19 (8): 1053–57.
- Oliveira, Talita Mendes de, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho, Iwysen Henrique Fernandes da Costa, Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Alexandre Araujo de Souza, Sidney Gonçalo de Lima, and Rivelilson Mendes de Freitas. 2015. "Evaluation of P-Cymene, a Natural Antioxidant."

## Referencias

---

- Pharmaceutical Biology* 53 (3): 423–28.
- Organización Panamericana de la Salud. 2016. “Indicadores Básicos 2016. Situación de La Salud En Las Américas.” <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/31288>.
- Ortega-Domínguez, Bibiana, Marlene Herrera-Ramírez, and Angeles C Tecalco-Cruz. 2015. “Receptores Nucleares: Del Núcleo Al Citoplasma.” *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas* 18 (2): 131–43.
- Osmak, Maja. 2012. “Statins and Cancer: Current and Future Prospects.” *Cancer Letters* 324 (1): 1–12.
- Ouyang, L, Z Shi, S Zhao, F-T Wang, T-T Zhou, B Liu, and J-K Bao. 2012. “Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis.” *Cell Proliferation* 45 (6): 487–98.
- Panizzi, L, Guido Flamini, P L Cioni, and Ivano Morelli. 1993. “Composition and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Four Mediterranean Lamiaceae.” *Journal of Ethnopharmacology* 39 (3): 167–70.
- Pastori, Daniele, Licia Polimeni, Francesco Baratta, Arianna Pani, Maria Del Ben, and Francesco Angelico. 2015. “The Efficacy and Safety of Statins for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Digestive and Liver Disease* 47 (1): 4–11.
- Pedersen, Terje R, and Jonathan A Tobert. 1996. “Benefits and Risks of HMG-CoA Reductase Inhibitors in the Prevention of Coronary Heart Disease.” *Drug Safety* 14 (1): 11–24.
- Peffley, Dennis M, and Apurba K Gayen. 2003. “Plant-Derived Monoterpenes Suppress Hamster Kidney Cell 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme a Reductase Synthesis at the Post-Transcriptional Level.” *The Journal of Nutrition* 133 (1): 38–44.
- Pelton, Kristine, Michael R Freeman, and Keith R Solomon. 2012. “Cholesterol and Prostate Cancer.” *Current Opinion in Pharmacology* 12 (6): 751–59.
- Pisoschi, Aurelia Magdalena, and Aneta Pop. 2015. “The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74.
- Polo, M P, R Crespo, and M G De Bravo. 2011. “Geraniol and Simvastatin Show a Synergistic Effect on a Human Hepatocarcinoma Cell Line.” *Cell Biochemistry and Function* 29 (6): 452–58.
- Polo, Monica P, and Margarita G De Bravo. 2006. “Effect of Geraniol on Fatty-Acid and Mevalonate Metabolism in the Human Hepatoma Cell Line Hep G2.” *Biochemistry and Cell Biology* 84 (1): 102–11.
- Portincasa, Piero, Antonio Moschetta, and Giuseppe Palasciano. 2006. “Cholesterol Gallstone Disease.” *The Lancet* 368 (9531): 230–39.
- Quiroga, Ivana Yoseli. 2017. “Síntesis de Novo de Glicerolípidos En Macrófagos.” Facultad de Ciencias Médicas.

## Referencias

---

- Rashid, Umer, Muhammad Ibrahim, Shahid Yasin, Robiah Yunus, Y H Taufiq-Yap, and Gerhard Knothe. 2013. "Biodiesel from Citrus Reticulata (Mandarin Orange) Seed Oil, a Potential Non-Food Feedstock." *Industrial Crops and Products* 45: 355–59.
- Ren, Zhibin, Charles E Elson, and Michael N Gould. 1997. "Inhibition of Type I and Type II Geranylgeranyl-Protein Transferases by the Monoterpene Perillyl Alcohol in NIH3T3 Cells." *Biochemical Pharmacology* 54 (1): 113–20.
- Ricci, E M, S B Padín, A Kahan, and S Ré. 2002. "Efecto Repelente de Los Aceites Esenciales de Laurel y Lemongrass Sobre Brevicoryne Brassicae L.(Homoptera: Aphididae) En Repollo." *Bol. San. Veg. Plagas* 28: 207–12.
- Ridley, Anne J. 2001. "Rho GTPases and Cell Migration." *Journal of Cell Science* 114 (15): 2713–22.
- . 2004. "Rho Proteins and Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 84 (1): 13–19.
- Rivera-Andrade, Alvaro, and Max A Luna. 2014. "Trends and Heterogeneity of Cardiovascular Disease and Risk Factors across Latin American and Caribbean Countries." *Progress in Cardiovascular Diseases* 57 (3): 276–85.
- Roberto, Davicino, Patricia Micucci, Turner Sebastian, Ferraro Graciela, and Claudia Anesini. 2010. "Antioxidant Activity of Limonene on Normal Murine Lymphocytes: Relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Modulation and Cell Proliferation." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 106 (1): 38–44.
- Rodrigo, María J, Berta Alquézar, Enriqueta Alós, Joanna Lado, and Lorenzo Zacarías. 2013. "Biochemical Bases and Molecular Regulation of Pigmentation in the Peel of Citrus Fruit." *Scientia Horticulturae* 163: 46–62.
- Rodriguez-Amaya, Delia B. 1999. *Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de Los Carotenoides Provitamina A En Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados*. Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos.
- Rodríguez, Martha A Sánchez, Edelmiro Santiago Osorio, Luis Alberto Vargas, and Víctor Manuel Mendoza Núñez. 2004. "Propuesta de Un Constructo Para Evaluar Integralmente El Estrés Oxidativo." *Bioquímica* 29 (3): 81–90.
- Ros, Emilio. 2006. "Doble Inhibición Del Colesterol: Papel de La Regulación Intestinal y Hepática." *Revista Española de Cardiología* 6 (Supl. G): 52–62.
- Ross, Russell. 1999. "Atherosclerosis—an Inflammatory Disease." *New England Journal of Medicine* 340 (2): 115–26.
- Rowe, Andrea H, Carmen A Argmann, Jane Y Edwards, Cynthia G Sawyez, Olivier H Morand, Robert A Hegele, and Murray W Huff. 2003. "Enhanced Synthesis of the Oxysterol 24 (S), 25-Epoxycholesterol in Macrophages by Inhibitors of 2, 3-Oxidosqualene: Lanosterol Cyclase: A Novel

## Referencias

---

- Mechanism for the Attenuation of Foam Cell Formation.” *Circulation Research* 93 (8): 717–25.
- Ruberto, Giuseppe, and Maria T Baratta. 2000. “Antioxidant Activity of Selected Essential Oil Components in Two Lipid Model Systems.” *Food Chemistry* 69 (2): 167–74.
- Rueff, J, C Chiapella, J K Chipman, F Darroudi, I Duarte Silva, M Duverger-van Bogaert, E Fonti, H R Glatt, P Isern, and A Laires. 1996. “Development and Validation of Alternative Metabolic Systems for Mutagenicity Testing in Short-Term Assays.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 353 (1): 151–76.
- Rygaard, Jørgen, and Carl O Poulsen. 1969. “Heterotransplantation of a Human Malignant Tumour to ‘Nude’ Mice.” *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 77 (4): 758–60.
- Sandoval Usme, María Claudia. 2012. “Mecanismos Moleculares de Las Estatinas Sobre El Cáncer.” Universidad Nacional de Colombia.
- Sangwan, N S, A H A Farooqi, F Shabih, and R S Sangwan. 2001. “Regulation of Essential Oil Production in Plants.” *Plant Growth Regulation* 34 (1): 3–21.
- Santos, Claudio R, and Almut Schulze. 2012. “Lipid Metabolism in Cancer.” *The FEBS Journal* 279 (15): 2610–23.
- Sawamura, Masayoshi, Nguyen Thi Minh Tu, Yuji Onishi, Eriko Ogawa, and Hyang-Sook Choi. 2004. “Characteristic Odor Components of Citrus Reticulata Blanco (Ponkan) Cold-Pressed Oil.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (8): 1690–97.
- Scaglia, Natalia, Svitlana Tyekucheva, Giorgia Zadra, Cornelia Photopoulos, and Massimo Loda. 2014. “De Novo Fatty Acid Synthesis at the Mitotic Exit Is Required to Complete Cellular Division.” *Cell Cycle* 13 (5): 859–68.
- Schwartz, A L, Sharon E Fridovich, Barbara B Knowles, and H F Lodish. 1981. “Characterization of the Asialoglycoprotein Receptor in a Continuous Hepatoma Line.” *Journal of Biological Chemistry* 256 (17): 8878–81.
- Searle, Jennifer S, Kaila L Schollaert, Benjamin J Wilkins, and Yolanda Sanchez. 2004. “The DNA Damage Checkpoint and PKA Pathways Converge on APC Substrates and Cdc20 to Regulate Mitotic Progression.” *Nature Cell Biology* 6 (2): 138.
- Sever, Richard, and Joan S Brugge. 2015. “Signal Transduction in Cancer.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (4): a006098.
- Sharpe, Laura J, and Andrew J Brown. 2013. “Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR).” *Journal of Biological Chemistry*, jbc-R113.
- Sinagra, D, C Amato, A M Scarpitta, M Brigandi, M Amato, G Saura, M A Latteri, and G Caimi. 2002. “Metabolic Syndrome and Breast Cancer Risk.” *European Review for Medical and Pharmacological*

- Sciences* 6: 55–59.
- Singh, Priyanka, Ravindra Shukla, Bhanu Prakash, Ashok Kumar, Shubhra Singh, Prashant Kumar Mishra, and Nawal Kishore Dubey. 2010. "Chemical Profile, Antifungal, Antiaflatoxigenic and Antioxidant Activity of Citrus Maxima Burm. and Citrus Sinensis (L.) Osbeck Essential Oils and Their Cyclic Monoterpene, DL-Limonene." *Food and Chemical Toxicology* 48 (6): 1734–40.
- Soberón, María Victoria. 2017. "Análisis Del Efecto Antioxidante y Antiproliferativo de Geraniol Para Su Potencial Uso Quimiopreventivo y/o Quimioterapéutico." UNLP.
- Song, Min Sup, Su Jeong Song, Nagi G Ayad, Jin Sook Chang, Joo Hyun Lee, Hyun Kyung Hong, Ho Lee, Naeyun Choi, Jhingook Kim, and Hojoong Kim. 2004. "The Tumour Suppressor RASSF1A Regulates Mitosis by Inhibiting the APC–Cdc20 Complex." *Nature Cell Biology* 6 (2): 129.
- Sousa, Allyne Carvalho De, Cerli Rocha Gattass, Daniela Sales Alviano, Celuta Sales Alviano, Arie Fitzgerald Blank, and Péricles Barreto Alves. 2004. "Melissa Officinalis L. Essential Oil: Antitumoral and Antioxidant Activities." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (5): 677–81.
- Sousa, Damião Pergentino De. 2015. *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer.
- Spencer, Thomas A, Apurba K Gayen, Seloka Phirwa, James A Nelson, F R Taylor, A A Kandutsch, and S K Erickson. 1985. "24 (S), 25-Epoxycholesterol. Evidence Consistent with a Role in the Regulation of Hepatic Cholesterogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 260 (25): 13391–94.
- Staedler, Davide, Catherine Chapuis-Bernasconi, Henrietta Dehmlow, Holger Fischer, Lucienne Juillerat-Jeanneret, and Johannes D Aebi. 2012. "Cytotoxic Effects of Combination of Oxidosqualene Cyclase Inhibitors with Atorvastatin in Human Cancer Cells." *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (11): 4990–5002.
- Stahl, Wilhelm, and Helmut Sies. 2003. "Antioxidant Activity of Carotenoids." *Molecular Aspects of Medicine* 24 (6): 345–51.
- Steinberg, Daniel. 1997. "Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance." *Journal of Biological Chemistry* 272 (34): 20963–66.
- Steuer, B, H Schulz, and E Läger. 2001. "Classification and Analysis of Citrus Oils by NIR Spectroscopy." *Food Chemistry* 72 (1): 113–17.
- Strykowska-Góra, Aleksandra, Bożenna Karczmarek-Borowska, Tomasz Góra, and Katarzyna Krawczak. 2015. "Statins and Cancers." *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia* 19 (3): 167–75.
- Sun, Jidong. 2007. "D-Limonene: Safety and Clinical Applications." *Alternative Medicine Review* 12 (3): 259.
- Sun, Jie, Yi-Fang Chu, Xianzhong Wu, and Rui Hai Liu. 2002. "Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25): 7449–54.

## Referencias

---

- Svoboda, Katerina P, Tomas G Svoboda, and A D Syred. 2000. "Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants." *Powys, UK, Microscopix*.
- Swanson, Kelly M, and Raymond J Hohl. 2006. "Anti-Cancer Therapy: Targeting the Mevalonate Pathway." *Current Cancer Drug Targets* 6 (1): 15–37.
- Sylvester, Paul W. 2012. "Synergistic Anticancer Effects of Combined  $\gamma$ -Tocotrienol with Statin or Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment." *Genes & Nutrition* 7 (1): 63.
- Tabatabaei-Malazy, Ozra, Bagher Larijani, and Mohammad Abdollahi. 2015. "Targeting Metabolic Disorders by Natural Products." *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 14 (1): 57.
- Tall, A R. 2008. "Cholesterol Efflux Pathways and Other Potential Mechanisms Involved in the Athero-protective Effect of High Density Lipoproteins." *Journal of Internal Medicine* 263 (3): 256–73.
- Tanaka, Takuji, Masahito Shnimizu, and Hisataka Moriwaki. 2012. "Cancer Chemoprevention by Carotenoids." *Molecules* 17 (3): 3202–42.
- Tapiero, H, D M Townsend, and K D Tew. 2004. "The Role of Carotenoids in the Prevention of Human Pathologies." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 58 (2): 100–110.
- Taylor, Fiona, Kirsten Ward, Theresa H M Moore, Margaret Burke, George Davey Smith, Juan P Casas, and Shah Ebrahim. 2011. "Statins for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 1: CD004816.
- Thurnher, Martin, Georg Gruenbacher, and Oliver Nussbaumer. 2013. "Regulation of Mevalonate Metabolism in Cancer and Immune Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (6): 1009–15.
- Thurnher, Martin, Oliver Nussbaumer, and Georg Gruenbacher. 2012. "Novel Aspects of Mevalonate Pathway Inhibitors as Antitumor Agents." *Clinical Cancer Research* 18 (13): 3524–31.
- Tirado, C Blanco, E E Stashenko, M Y Combariza, and J R Martinez. 1995. "Comparative Study of Colombian Citrus Oils by High-Resolution Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography A* 697 (1–2): 501–13.
- Tobias, Peter, and Linda K Curtiss. 2005. "Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. Paying the Price for Pathogen Protection: Toll Receptors in Atherogenesis." *Journal of Lipid Research* 46 (3): 404–11.
- Trachootham, Donyaporn, Weiqin Lu, Marcia A Ogasawara, Nilsa Rivera-Del Valle, and Peng Huang. 2008. "Redox Regulation of Cell Survival." *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (8): 1343–74.
- Trialists, Cholesterol Treatment. 2008. "Efficacy of Cholesterol-Lowering Therapy in 18 686 People with Diabetes in 14 Randomised Trials of Statins: A Meta-Analysis." *The Lancet* 371 (9607): 117–25.
- Tumbas, Vesna T, Gordana S Četković, Sonja M Đilas, Jasna M Čanadanović-Brunet, Jelena J Vulić, Željko

## Referencias

---

- Knez, and Mojca Škerget. 2010. "Antioxidant Activity of Mandarin (*Citrus Reticulata*) Peel." *Acta Periodica Technologica*, no. 41: 195–203.
- Unit, Epidemiological Studies. 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): 1267–78.
- Valenzuela, Alfonso, Julio Sanhueza, Pilar Alonso, Alicia Corbari, and Susana Nieto. 2004. "Inhibitory Action of Conventional Food-Grade Natural Antioxidants and of Natural Antioxidants of New Development on the Thermal-Induced Oxidation of Cholesterol." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55 (2): 155–62.
- Veen, Jelske N van der, Theo H van Dijk, Carlos L J Vrans, Hester van Meer, Rick Havinga, Klaas Bijsterveld, Uwe J F Tietge, Albert K Groen, and Folkert Kuipers. 2009. "Activation of the Liver X Receptor Stimulates Trans-Intestinal Excretion of Plasma Cholesterol." *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.
- Vivanco, Igor, and Charles L Sawyers. 2002. "The Phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT Pathway in Human Cancer." *Nature Reviews Cancer* 2 (7): 489.
- Voutilainen, Sari, Tarja Nurmi, Jaakko Mursu, and Tiina H Rissanen. 2006. "Carotenoids and Cardiovascular Health—." *The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (6): 1265–71.
- Wadhera, Rishi K, Dylan L Steen, Irfan Khan, Robert P Giugliano, and JoAnne M Foody. 2016. "A Review of Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Treatment Strategies, and Its Impact on Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality." *Journal of Clinical Lipidology* 10 (3): 472–89.
- Walker, Katharine, and Michael F Olson. 2005. "Targeting Ras and Rho GTPases as Opportunities for Cancer Therapeutics." *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (1): 62–68.
- Wang, David Q H, David E Cohen, and Martin C Carey. 2009. "Biliary Lipids and Cholesterol Gallstone Disease." *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S406–11.
- Wang, Yuan-Chuen, Yueh-Chueh Chuang, and Hsing-Wen Hsu. 2008. "The Flavonoid, Carotenoid and Pectin Content in Peels of Citrus Cultivated in Taiwan." *Food Chemistry* 106 (1): 277–84.
- Wannes, Wissem Aidi, Baya Mhamdi, Jazia Sriti, Mariem Ben Jemia, Olfa Ouchikh, Ghaith Hamdaoui, Mohamed Elyes Kchouk, and Brahim Marzouk. 2010. "Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts from Myrtle (*Myrtus Communis* Var. *Italica* L.) Leaf, Stem and Flower." *Food and Chemical Toxicology* 48 (5): 1362–70.
- Wattenberg, Lee W, and Judith B Coccia. 1991. "Inhibition of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Carcinogenesis in Mice by D-Limonene and Citrus Fruit Oils." *Carcinogenesis* 12 (1): 115–17.



## Referencias

---

- Wendel, Angela A, Tal M Lewin, and Rosalind A Coleman. 2009. "Glycerol-3-Phosphate Acyltransferases: Rate Limiting Enzymes of Triacylglycerol Biosynthesis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (6): 501–6.
- Wolfensohn, Sarah, and Maggie Lloyd. 2008. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. John Wiley & Sons.
- Wright, Latasha P, and Mark R Philips. 2006. "Thematic Review Series: Lipid Posttranslational Modifications CAAX Modification and Membrane Targeting of Ras." *Journal of Lipid Research* 47 (5): 883–91.
- Wulp, Mariëtte Y M van der, Henkjan J Verkade, and Albert K Groen. 2013. "Regulation of Cholesterol Homeostasis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 368 (1–2): 1–16.
- Yang, Chao, Hui Chen, Hongli Chen, Balian Zhong, Xuzhong Luo, and Jiong Chun. 2017. "Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel." *Molecules* 22 (8): 1391.
- Yeganeh, Behzad, Emilia Wiechec, Sudharsana R Ande, Pawan Sharma, Adel Rezaei Moghadam, Martin Post, Darren H Freed, Mohammad Hashemi, Shahla Shojaei, and Amir A Zeki. 2014. "Targeting the Mevalonate Cascade as a New Therapeutic Approach in Heart Disease, Cancer and Pulmonary Disease." *Pharmacology & Therapeutics* 143 (1): 87–110.
- Yoshida, Hiroshi, and Reiko Kisugi. 2010. "Mechanisms of LDL Oxidation." *Clinica Chimica Acta* 411 (23–24): 1875–82.
- Yu, Lianfang, Xiaoru Li, Shaoyin Liu, Guangwei Xu, and Yizeng Liang. 2009. "Comparative Analysis of Volatile Constituents in Citrus Reticulata Blanco Using GC–MS and Alternative Moving Window Factor Analysis." *Journal of Separation Science* 32 (20): 3457–65.
- Zadra, Giorgia, Cornelia Photopoulos, and Massimo Loda. 2013. "The Fat Side of Prostate Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (10): 1518–32.
- Zhang, Feng, and Guangwei Du. 2012. "Dysregulated Lipid Metabolism in Cancer." *World Journal of Biological Chemistry* 3 (8): 167.
- 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." *Clinical and Translational Oncology* 16 (8): 708–13.
- Zhang, Xinbo, William Sessa, and Carlos Fernández-Hernando. 2018. "Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 130.
- Zhang, Yuanmei, Yujing Sun, Wanpeng Xi, Yan Shen, Liping Qiao, Liezhou Zhong, Xingqian Ye, and Zhiqin Zhou. 2014. "Phenolic Compositions and Antioxidant Capacities of Chinese Wild Mandarin (Citrus Reticulata Blanco) Fruits." *Food Chemistry* 145: 674–80.



## Referencias

---

Zhou, Qian, and James K Liao. 2009. "Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy." *Current Pharmaceutical Design* 15 (5): 467–78.