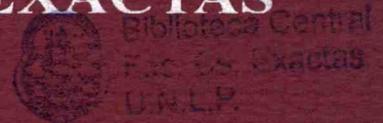


01093



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



ACTIVIDAD HMG CoA REDUCTASA Y
HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL

RELACION ENTRE COLESTEROGENESIS Y
CRECIMIENTO CELULAR

Mónica Patricia Polo

Directores de tesis

Prof. Dra. Margarita M. García de Bravo

Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz

Handwritten: TESIS 01093

(043.2)
TESIS
01093

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/9 int. 129



DEX-57466

TESIS
1997

BOFADICION

Fecha 08-05-05

Inv. 2005

57466



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



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

**ACTIVIDAD HMG CoA REDUCTASA Y
HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL**

**RELACION ENTRE COLESTEROGENESIS Y
CRECIMIENTO CELULAR**

Mónica Patricia Polo

Directores de tesis

Prof. Dra. Margarita M. García de Bravo

Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz

TESIS

1997

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

**a mi Esposo, a mi Hija
a mis Padres.-**

Mi reconocimiento:

al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, en la persona de su Director: Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner, por haberme brindado los medios materiales necesarios para la realización de este trabajo,

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

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por las becas que me otorgara oportunamente,

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires y a la Universidad Nacional de La Plata, por haber brindado el apoyo económico necesario para desarrollar el presente trabajo a través de sucesivos subsidios.-

Mi agradecimiento:

a la Dra. Margarita M. García de Bravo, por brindarme su inmensa calidez humana, por su estímulo y comprensión permanentes, por las horas de su tiempo cedidas gentilmente a mi entrenamiento técnico-científico, por el clima de respeto y amistad que genera en todos los ámbitos donde desempeña sus funciones, y por enseñarme con su ejemplo que la vida familiar armoniosa y el desempeño de tareas de investigación de modo responsable y eficiente pueden compatibilizarse perfectamente,

a la Dra. María J. Tacconi de Alaniz, por su guía y apoyo incondicionales en momentos difíciles en los cuales el rumbo no parecía definido, y por sus consejos justos, objetivos y precisos, tanto en lo laboral como en lo personal,

al Dr. Osvaldo Mercuri, por brindarme la posibilidad de iniciarme en el trabajo científico,

a la Dra. Ana M. Cortizo, por haber aceptado la responsabilidad de ser mi Asesor Académico ante la Fac. de Ciencias Exactas, y por su interés en el avance y conclusión de mis trabajos de investigación,

a la Sra. Marisa Prinzo, por su colaboración técnica.
A ella y a mis compañeros de laboratorio Lic. Laura Albino y Bioq. Graciela Peterson, por tantas horas compartidas en franca amistad y apoyo humano,

a todo el personal del INIBIOLP , quienes de una u otra forma también hicieron posible la ejecución de este trabajo,

a mi esposo, Carlos, y a mi hija, Carla, por todos estos años en los cuales la pequeña familia que conformamos ha sido un cálido refugio espiritual que permitió un rendimiento intelectual máximo, por su amor, apoyo, comprensión, por TODO.-

- ÍNDICE -

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
I.A. CONSIDERACIONES GENERALES	1
I.B. ROL DEL HÍGADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL CORPORAL Y DE LA COLESTEROLEMIA	2
I.B.1. Balance de Colesterol en el Animal Entero.....	4
I.B.2. Integración de las Fuentes Endógena y Exógena de Colesterol. Importancia Relativa del Hígado en la Síntesis Corporal Total de Colesterol ..	5
I.B.3. Regulación de la Concentración Plasmática del Colesterol Transportado por Lipoproteínas de Baja Densidad	7
I.C. RUTA BIOSINTÉTICA DEL COLESTEROL	9
I.C.1. Control de la Síntesis de Colesterol. La <i>HMG-CoA</i> Reductasa	15
I.C.2. Inhibidores de la Síntesis de Colesterol y Colesterolemia	23
I.D. DESTINOS ALTERNATIVOS DEL MEVALONATO	27
I.E. ROL DE LA COLESTEROGÉNESIS Y SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN LA REPLICACIÓN DEL DNA Y CRECIMIENTO CELULAR.....	32
I.F. OBJETIVOS	38

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.A. MATERIALES UTILIZADOS	40
II.A.1. Drogas Radiactivas.....	40
II.A.2. Drogas No Radiactivas.....	41
II.B. METODOLOGÍA	43
II.B.1. Metodología Específica Utilizada para Tumor Humano Heterotrans- plantado.....	43
II.B.1.a. Mantenimiento de los animales.....	43
II.B.1.b. Desarrollo y mantenimiento del tumor humano en ratones “nude”.....	46
II.B.1.c. Medida de las dimensiones tumorales	49
II.B.1.d. Obtención de sal sódica de Simvastatin	51
II.B.1.e. Obtención de microsomas lavados de hígado y tumor.....	51
II.B.1.f. Determinación de proteína microsomal.....	52
II.B.2. Metodología Específica Utilizada para Cultivo de Células.....	53
II.B.2.a. Cultivo de células tumorales en monocapa	53
II.B.2.b. Recuento de células y estimación de la viabilidad celular.....	56
II.B.2.c. Homogeneización de suspensiones de células cultivadas en monocapa.	58
II.B.2.d. Determinación de proteína celular total.....	58
II.B.2.e. Aislamiento de ácidos nucleicos celulares	59
II.B.2.f. Incorporación de sustratos exógenos radiactivos	60
II.B.2.f.1. Incorporación de acetato [$1\text{-}^{14}\text{C}$] en lípidos insaponificables y ácidos grasos de células y medio condicionado.....	60
II.B.2.f.2. Incorporación de colesterol [$1,2\text{-}^3\text{H(N)}$] en células Hep G2.....	60
II.B.2.f.3. Incorporación de Timidina [metil- ^3H] en ADN de células Hep G2	60
II.B.3. Metodología General.....	61
II.B.3.a. Ensayo de actividad HMG-CoA reductasa “in vitro”	61
II.B.3.b. Extracción de lípidos insaponificables y ácidos grasos totales.....	63
II.B.3.c. Separación de lípidos insaponificables por cromatografía en capa fina	64
II.B.3.d. Determinación del contenido de colesterol por GLC.....	64
II.B.3.e. Tratamiento estadístico de los resultados	67

CAPÍTULO III. ACTIVIDAD DE HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL EN EL MODELO TUMOR DE PULMÓN HUMANO/ RATONES ATÍMICOS. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SIMVASTATIN.

III.A. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA HEPÁTICA Y TUMORAL.....	68
III.A.1. Síntesis de mevalonato en función de la concentración de sustrato.....	69
III.A.2. Síntesis de mevalonato en función de la cantidad de proteína microsomal.....	71
III.B. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA Y CONTENIDO DE COLESTEROL. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL TUMOR SOBRE EL HÍGADO HUÉSPED.....	73
III.B.1. Actividad específica de la HMG-CoA reductasa.....	73
III.B.2. Contenido de colesterol.....	76
III.C. EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL HLMC DESARROLLADO EN RATONES NUDE, LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPÁTICO Y TUMORAL.....	79
III.C.1. Crecimiento tumoral y peso corporal.....	79
III.C.2. Actividad HMG-CoA reductasa total.....	82
III.C.3. Contenido de colesterol.....	84
III.D. DISCUSIÓN.....	87
III.D.1. Propiedades de la reductasa hepática y tumoral.....	87

III.D.2. Actividad HMG-CoA reductasa y contenido de colesterol hepático y tumoral.....	88
III.D.2.a. Variaciones mediodía/medianoche.....	88
III.D.2.b. Efecto de la presencia del tumor sobre el huésped.....	90
III.D.3. Efecto del simvastatin sobre el crecimiento del HLMC desarrollado en ratones nude, la actividad HMG-CoA reductasa y el contenido de colesterol hepático y tumoral.....	92
CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL EN UN HEPATOBLASTOMA HUMANO EN CULTIVO: EFECTOS DEL ETANOL. RELACIÓN ENTRE COLESTEROGÉNESIS Y CRECIMIENTO CELULAR.	
IV.A. PROPIEDADES DE LA HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2 EN FASE LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO.....	97
IV.A.1. Caracterización de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2.....	98
IV.A.2. Efecto del mevalonato sobre la actividad HMG-CoA reductasa en células Hep G2 incubadas en presencia y ausencia de suero fetal.....	103
IV.B. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS HEP G2 EN CULTIVO EN MONOCAPA.....	105
IV.C. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL EN CÉLULAS HEP G2 EN CULTIVO EN MONOCAPA. RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CRECIMIENTO CELULAR.....	109
IV.C.1. Actividad HMG-CoA reductasa, contenido de colesterol y crecimiento celular en presencia de concentraciones crecientes de etanol en el medio condicionado.....	109

IV.C.2. Actividad HMG-CoA reductasa y crecimiento celular en las horas posteriores al tratamiento con etanol.....	114
IV.C.3. Actividad HMG-CoA reductasa y crecimiento de células tratadas con etanol en presencia de mevalonato.....	116
IV.D. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL Y ÁCIDOS GRASOS Y SU ELIMINACIÓN AL MEDIO CONDICIONADO.....	118
IV.D.1. Efecto del etanol sobre la incorporación de acetato ¹⁴C en colesterol y ácidos grasos celulares y del medio condicionado en células Hep G2 ...	118
IV.D.2. Efecto del etanol sobre la eliminación de colesterol al medio condicionado por células Hep G2	121
IV.E. ENSAYO DE INTEGRIDAD CELULAR CON TIMIDINA TRITIADA.....	125
IV.F. DISCUSIÓN	128
IV.F.1. Elección de las Hep G2 en cultivo como modelo.....	128
IV.F.2. Efecto del etanol sobre el crecimiento y la actividad HMG-CoA reductasa de células Hep G2. Relación entre colesterogénesis y crecimiento celular	130
IV.F.3. Efecto del etanol sobre homeostasis del colesterol en células Hep G2...	133
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA.	140

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

I.A. CONSIDERACIONES GENERALES.

El colesterol es el principal esteroide y un componente esencial de todos los tejidos animales. Es un lípido anfipático que está presente en las bicapas lipídicas de las membranas celulares, donde su función más importante parece ser la modulación de la fluidez de las membranas. Además de su papel como constituyente de las membranas, es el precursor de diversos productos con actividades biológicas específicas: vitaminas, ácidos biliares y hormonas esteroideas.

El colesterol del organismo procede de la dieta, absorbido a nivel intestinal, o de su síntesis *de novo* a partir de acetyl-CoA. Dicha síntesis tiene lugar prácticamente en todos los tejidos, pero es especialmente activa en hígado, corteza renal, piel, intestino y aorta. 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.

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



satisfacer las necesidades de los distintos tejidos. En situaciones patológicas tiene lugar un desequilibrio de dichos procesos, lo que lleva a un incremento de los niveles circulantes de colesterol o a un exceso del mismo que es eliminado por vía biliar. En el primer caso, los ésteres de colesterol pueden llegar a acumularse en las células de la pared arterial y originar el desarrollo de la arteriosclerosis. En el segundo, la bilis puede llegar a sobresaturarse de colesterol, que al final precipita, dando lugar a cálculos biliares.

El colesterol alcanza notoriedad debido a la fuerte correlación entre los niveles elevados de colesterol en sangre (hipercolesterolemia), fundamentalmente transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL), y la incidencia de enfermedades del sistema cardiovascular en el hombre. La popularidad 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. Uno de los hallazgos más relevantes respecto a la vía de síntesis de colesterol a partir de acetato es el hecho de que intermediarios claves de la misma son precursores de productos finales, distintos del colesterol, que desempeñan un rol importante en la replicación del DNA.

I.B. ROL DEL HÍGADO EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL CORPORAL Y DE LA COLESTEROLEMIA.

El contenido de colesterol varía de un tejido a otro; por ejemplo es de 0,5 g/kg en el músculo y de 15 g/kg en el cerebro, pero en el individuo completo es de aproximadamente 1,4 g/kg. Este colesterol corporal proviene exclusivamente de dos fuentes: síntesis endógena a partir de acetyl-CoA y absorción del colesterol dietario en el intestino proximal. La velocidad de síntesis de colesterol por Kg. de peso varía de una especie a otra en relación inversa con la masa corporal y dentro

de la misma especie disminuye desde la juventud hasta la vejez (1, 2). Por otra parte, la colesterogénesis es regulada en cada una de las células del organismo por un proceso de retroalimentación negativa ejercida por el propio colesterol sobre la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (enzima limitante del flujo de la vía, según se describirá luego), de modo que la síntesis de colesterol corporal se verá marcadamente influenciada por la cantidad de colesterol ingerida con la dieta. Es claro entonces que, la importancia relativa de las fuentes endógena y exógena de colesterol depende de la especie en consideración y del contenido de colesterol de la dieta administrada. Así, la cantidad de colesterol sintetizada en el hombre puede superar en 2 o 3 veces la absorbida aún en condiciones de alto contenido de colesterol en la dieta. Mientras que, en la rata ocurre lo contrario, ya que el colesterol de síntesis es muy inferior al absorbido cuando la dieta es rica en este compuesto.

El colesterol es excretado del organismo en forma inalterada o previa transformación en otros productos esteroides. Si bien, pequeñas cantidades de colesterol son perdidas a través de desprendimiento de células de la piel y el epitelio intestinal y por conversión a varias hormonas esteroideas, la principal vía de eliminación de colesterol del organismo es su excreción a través de la secreción de esteroides en bilis por células del parénquima hepático (3). Este proceso incluye la secreción directa de colesterol y el movimiento transcanalicular de ácidos biliares (ácidos cólico y quenodesoxicólico), el producto metabólico final de la degradación de colesterol por el hígado (4). Estos ácidos son sintetizados en el hígado a través de una vía controlada por el retorno de ácidos y sales biliares por circulación enterohepática en la cual la 7α -hidroxilasa es la enzima limitante de flujo.

I.B.1. BALANCE DE COLESTEROL EN EL ANIMAL ENTERO.

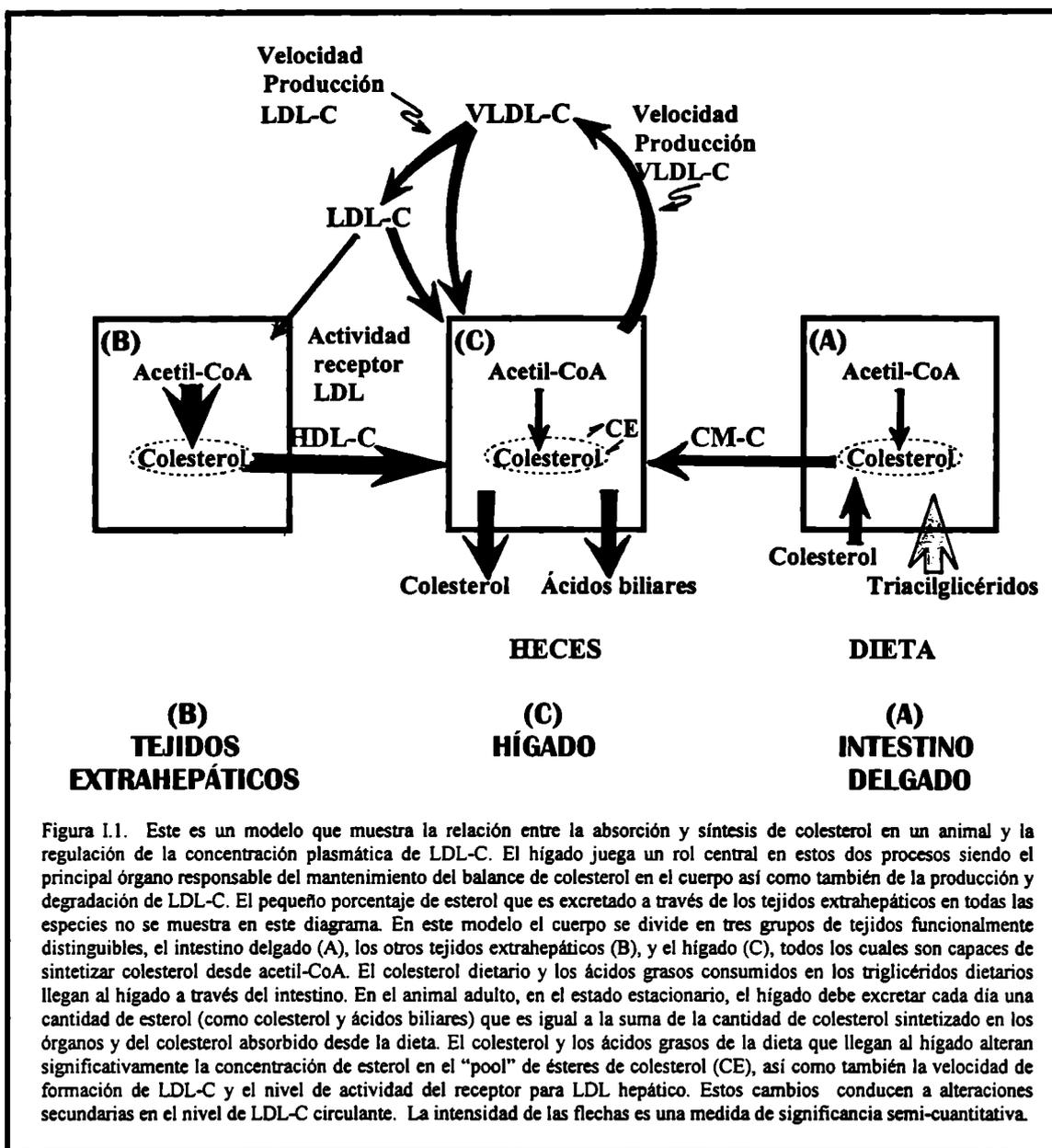
En individuos en edad de crecimiento, una importante cantidad del colesterol (endógeno y exógeno) es incorporado a los tejidos nuevos (1,4 g/kg de peso corporal ganado). Esto implica que bajo tales circunstancias, la entrada de colesterol al organismo debe superar a su excreción, para mantener así el balance positivo adecuado. En individuos adultos en cambio, si bien existe un progresivo acúmulo de colesterol en determinadas zonas como pared de los vasos sanguíneos y en el plasma, la cantidad de colesterol total permanece prácticamente inalterada durante períodos muy prolongados. Por lo tanto, en el animal adulto una cantidad de colesterol igual a la que se sintetiza más la que se absorbe debe ser excretada cada día.

De este modo como se ilustra en la Figura I.1, en el animal adulto, una cantidad de colesterol igual a la que es sintetizada cada día en los tejidos extrahepáticos (B) debe ser transportada a través del plasma, presumiblemente llevada en HDL (HDL-C) (5, 6), al hígado. Similarmente, el esterol tanto sintetizado como absorbido en el intestino delgado (A) debe también transportarse al hígado, en este caso la partícula quilomicrón (CM-C) es el transportador primario en el plasma (7). En el estado estacionario, en el cual el peso del animal es constante y no están ocurriendo cambios en la concentración de colesterol en ningún compartimiento o tejido, la velocidad de síntesis y absorción de colesterol debe ser igual a la velocidad absoluta de excreción de colesterol y de ácidos biliares en las heces (más la pequeña cantidad de esteroides perdida desde la piel o convertida en varias hormonas).

I.B.2. INTEGRACIÓN DE LAS FUENTES ENDÓGENA Y EXÓGENA DE COLESTEROL. IMPORTANCIA RELATIVA DEL HÍGADO EN LA SÍNTESIS CORPORAL TOTAL DE COLESTEROL.

Tal como se mencionó antes, la velocidad de síntesis determinada en el animal entero depende en gran medida de la cantidad de colesterol absorbido a nivel intestinal. La contribución de cada órgano a la variación de la velocidad total es muy dispar. Como puede observarse en la Figura I.1., el pool de colesterol en las células del epitelio intestinal y en el hígado está más influenciado por una alteración del balance neto de colesterol que en el resto de los tejidos del organismo. Por lo tanto la velocidad de síntesis de esteroides se verá particularmente afectada en estos dos órganos por variaciones de la cantidad de colesterol absorbido en el intestino delgado. Por ejemplo, si se incrementa el ingreso neto de colesterol al cuerpo por adición de pequeñas cantidades de colesterol a la dieta, se observa una marcada supresión de la velocidad de síntesis de colesterol hepática, una supresión parcial de síntesis intestinal, y virtualmente no hay cambios en la síntesis de órganos extrahepáticos (7 - 10). Por el contrario, si la pérdida neta de colesterol desde el cuerpo se incrementa por bloqueo de la reabsorción intestinal de ácidos biliares y colesterol o por ingesta de fibras solubles, la velocidad de síntesis de colesterol en hígado y, en menor extensión, en intestino se incrementa para compensar esta pérdida, mientras que en órganos extrahepáticos permanece esencialmente sin cambio (9 - 12).

De modo que, la contribución relativa del hígado a la síntesis de colesterol corporal depende críticamente de la cantidad neta de colesterol que llega al hígado desde el intestino. Estimaciones de la importancia del hígado en humanos sugieren que este órgano es un contribuyente relativamente menor a la síntesis del cuerpo entero (5-10 %). En todas las especies estudiadas, bajo condiciones dietarias equivalentes a la alimentación humana occidental, los tejidos extrahepáticos contribuyen con más del 80 % de la síntesis de esteroides del animal entero (13).



I.B.3. REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DEL COLESTEROL TRANSPORTADO POR LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-C).

El hígado también juega un rol central en el metabolismo del colesterol transportado por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C) y de baja densidad (LDL-C) (7). Si bien la principal función de las partículas VLDL parece ser el transporte de triacilglicéridos desde el hígado a los órganos periféricos para oxidación o almacenaje, estas partículas también contienen colesterol libre y esterificado; este esteroles es secretado desde el hígado en estas partículas a una velocidad definida como velocidad de producción de VLDL-C (Fig. I.1). Durante el metabolismo de las partículas de VLDL, con la remoción de una extensa porción del corazón de triacilglicéridos en los tejidos periféricos, se forma una partícula remanente y una porción de estas partículas (derivadas de las VLDL) es convertida a LDL a una velocidad definida como la velocidad de producción de LDL-C (14).

Tanto las LDL como las partículas remanentes de VLDL son extensamente removidas del plasma por receptores para LDL localizados en el hígado (15) mientras que, una pequeña cantidad (20-40 %) de LDL es eliminada del plasma por los tejidos extrahepáticos fundamentalmente a través de un mecanismo receptor independiente (16 - 19).

La actividad del receptor para LDL depende inversamente de la cantidad de colesterol que llega a las células y también puede ser modificada por el tipo de ácidos grasos recibidos por las mismas (20). El colesterol intracelular se distribuye en un pool de colesterol libre que regula la transcripción del receptor para LDL y en otro de colesterol esterificado con ácidos grasos, fundamentalmente ácido oleico, que es biológicamente inerte. En el estado estacionario el equilibrio entre ambos pools es dictado por la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT) cuya actividad relativa está determinada por la concentración de colesterol libre y la cantidad y tipo de ácidos grasos presentes en la célula. De modo que, si se

incrementa la cantidad de colesterol que llega a las células, se produce un aumento en paralelo de ambos pools de colesterol y una disminución de la actividad del receptor para LDL. Mientras que, cuando las células son enriquecidas con ácidos grasos que son sustratos pobres para la ACAT (14:0 y 16:0), se reduce la formación de ésteres de colesterol con lo cual se incrementa el pool regulatorio y disminuye la actividad del receptor para LDL. Contrariamente, si las células se enriquecen con ácidos grasos como oleico, el sustrato preferido por la ACAT, se incrementa la esterificación del colesterol celular y aumenta la actividad del receptor para LDL (20).

Cuando la actividad del receptor para LDL es suprimida, disminuye la velocidad de remoción de LDL-C fundamentalmente a nivel hepático y además muy poca de la VLDL remanente es eliminada del plasma determinando un incremento de la velocidad de producción de LDL-C. La sumatoria de estos fenómenos se traduce en una elevación de la concentración de LDL-C circulante ocasionando un desvío de la carga de LDL-C eliminada en el animal entero desde el hígado a los órganos extrahepáticos. Contrariamente, cuando la actividad del receptor para LDL está incrementada por la administración de sustancias que inhiben la reabsorción intestinal de esteroides o se bloquea la secreción de VLDL (21), la velocidad de producción de LDL-C disminuye y la concentración de LDL-C en plasma es baja.

Es claro entonces que, tanto el balance neto de colesterol corporal como el nivel de LDL-C circulante dependen críticamente de los eventos que ocurren en el hígado e indirectamente este órgano controla el flujo de colesterol en los órganos extrahepáticos.

I.C. RUTA BIOSINTÉTICA DEL COLESTEROL.

Según se describe antes, la síntesis *de novo* de colesterol varía de una especie a otra, y dentro de la misma especie en función de la edad, el estado nutricional y muchos otros factores, pudiendo superar a veces al colesterol de la dieta.

Prácticamente todos los tejidos con células nucleadas están capacitados para sintetizar colesterol a partir de acetil coenzima A, en un proceso que se lleva a cabo en forma escalonada y que ocurre en su totalidad fuera de las mitocondrias, con participación de las fracciones microsómica y soluble del citoplasma. La ruta multienzimática que conduce a la síntesis de colesterol a partir del acetato como único precursor fue originalmente descrita en hígado animal por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth, George Popják y otros a fines de 1950. Esta ruta puede considerarse dividida en las siguientes etapas:

1. Formación de mevalonato a partir de acetil-CoA.
2. Transformación de mevalonato en escualeno.
3. Transformación de escualeno en colesterol.

Formación de mevalonato

La síntesis de mevalonato comienza con la generación de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a partir de acetil-CoA. La secuencia de reacciones a través de las cuales se produce HMG-CoA es la misma que la observada en la síntesis de los cuerpos cetónicos, con la diferencia de ser extra en lugar de intramitocondrial, por lo que ambas vías están claramente diferenciadas dentro de la célula. Como se observa en la Figura I.2, dos moléculas de acetil-CoA se fusionan por acción de la enzima citosólica acetoacetil coenzima A (AA-CoA) tiolasa para dar lugar al acetoacetil-CoA, dejando libre una molécula de coenzima A. En la siguiente reacción, catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) sintetasa, el AA-CoA es condensado con una molécula adicional de

acetil-CoA para dar HMG-CoA (22). Estas dos reacciones citoplasmáticas son seguidas por una reacción mediada por una proteína integral del retículo endoplasmático (RE), HMG-CoA reductasa. En este proceso HMG-CoA es reducido a mevalonato en dos pasos, utilizando dos moléculas de NADPH (23, 24). Este es el primer paso involucrado específicamente con la síntesis de isoprenoides y el principal punto de regulación de la vía del colesterol, como se verá luego.

Transformación de mevalonato en escualeno

Mediante la participación secuencial de tres quinasas, el mevalonato es fosforilado hasta la formación de mevalonil-3-fosfo-5-difosfato (Figura I.3). Por acción de la difosfomevalonato descarboxilasa se pierde un carbono en forma de CO₂ y un fosfato, formándose isopentenil-pirofosfato (IPP). Tres moléculas de este compuesto se condensan, para lo cual la IPP isomerasa cataliza la isomerización de una de las moléculas de isopentenil-pirofosfato para formar dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). La condensación del dimetilalil-pirofosfato con una segunda molécula de isopentenil-pirofosfato origina geranil-pirofosfato (10 átomos de carbono), el cual se condensa a su vez con una tercera molécula de isopentenil-pirofosfato, dando lugar al farnesil-pirofosfato (15 átomos de carbono). Estas dos reacciones de condensación son catalizadas por las correspondientes sintasas, y en cada una de ellas se libera una molécula de pirofosfato (PP_i). Además DMAPP está también involucrado en la isoprenilación de ciertas especies de tRNA (25, 26). La enzima microsomal escualeno sintasa cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de farnesil-pirofosfato para dar preescualeno difosfato y luego la reducción del mismo para transformarlo en un segundo paso en escualeno usando NADH o NADPH como agente reductor. Este es el primer paso específicamente involucrado con la biosíntesis de colesterol. Mientras que la HMG-CoA reductasa es considerada la principal enzima reguladora de la biosíntesis de colesterol, la escualeno sintasa determina el flujo del FPP incorporado en colesterol. Al igual que

la HMG-CoA reductasa, la escualeno sintasa es inhibida por LDL-colesterol (27) y estimulada por tratamientos que disminuyen el contenido de colesterol celular (28).

Transformación de escualeno en colesterol

La representación espacial de la molécula de escualeno recuerda ya a la del núcleo esteroideo (Figura I.4). Las etapas posteriores del proceso van dirigidas a cerrar los correspondientes anillos de la molécula para generar la molécula de lanosterol, a partir de la cual se forma el colesterol.

La transformación de lanosterol en colesterol tiene lugar a través de numerosos pasos intermedios, catalizados por enzimas microsómicas, dependientes también algunas de ellas de oxígeno molecular y NADPH. Dichas etapas (Figura I.4) incluyen los siguientes pasos:

1. Pérdida del grupo metílico unido al C₁₄, con formación del 14-desmetil-lanosterol.
2. Eliminación de los dos grupos metílicos del C₄ y formación de zimosterol.
3. Salto del doble enlace de la posición C₈ a la C₅ (desmosterol).
4. Reducción del doble enlace en el C₂₄.

En realidad, la secuencia en que tienen lugar estas reacciones no se conoce con certeza, e incluso parece que el orden puede ser variable.

Los compuestos intermedios entre el escualeno y el colesterol están asociados a una proteína transportadora (proteína transportadora de esteroides o SPC, por su nombre en inglés), lo que permite que compuestos liposolubles reaccionen y difundan con facilidad en el medio acuoso celular. Se cree que el colesterol se transforma en otros compuestos (hormonas esteroideas o ácidos biliares), e incluso ejerce su control sobre la HMG-CoA reductasa asociado a dicha proteína transportadora (ver más adelante).

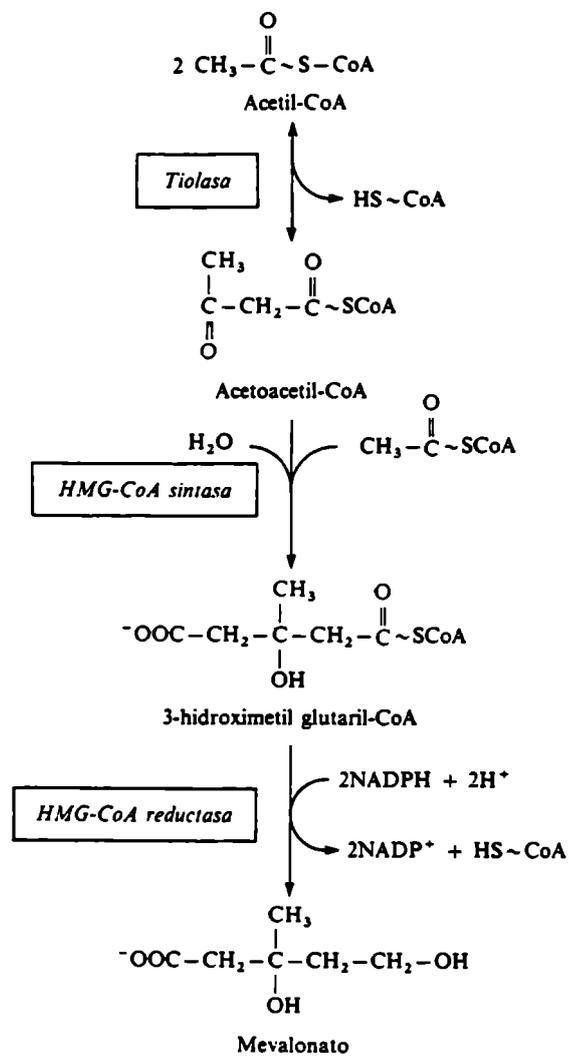


Figura I.2. Formación de mevalonato a partir de acetil-CoA, en la biosíntesis de colesterol..

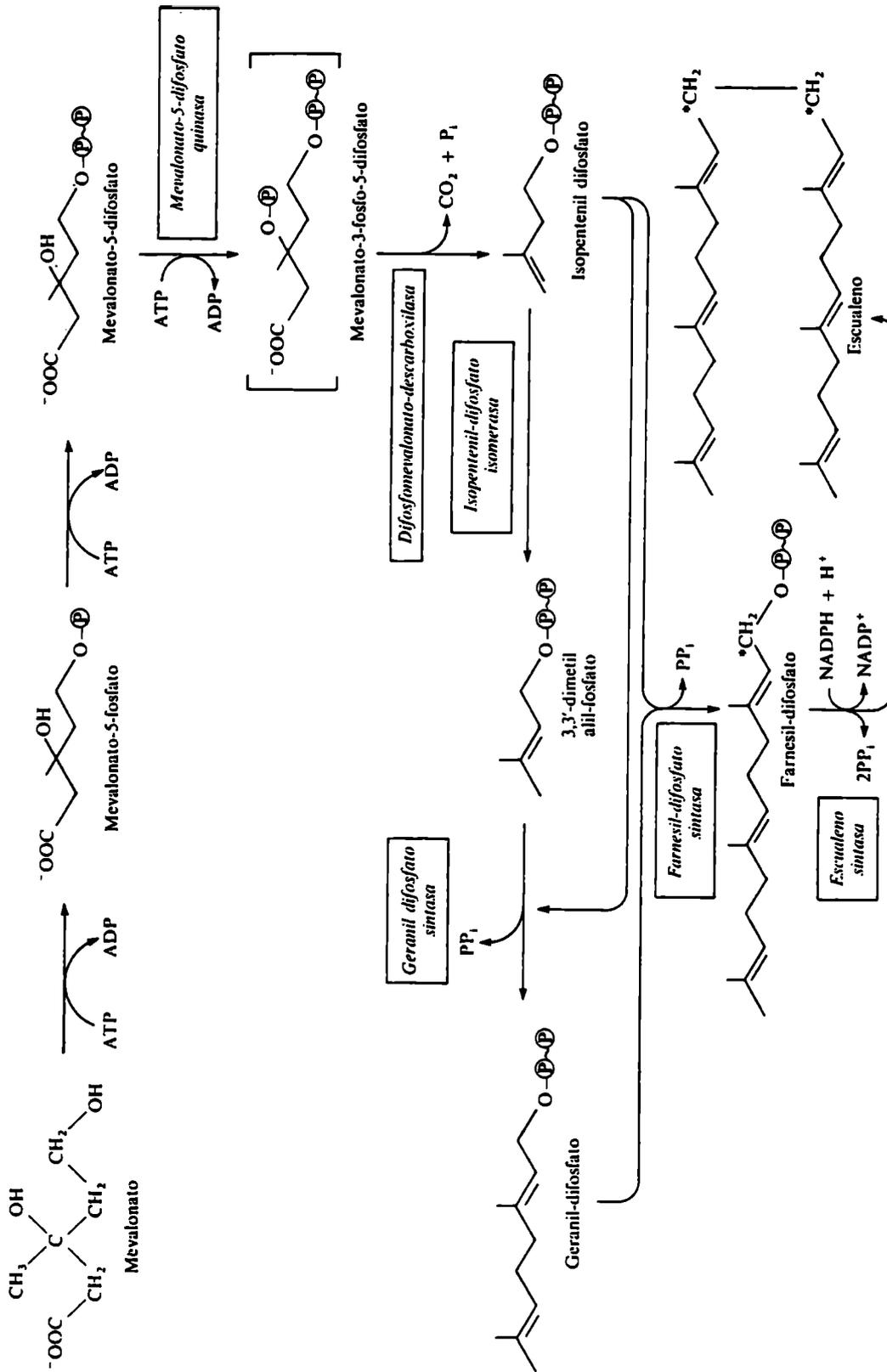


Figura I.3. Formación de escualeno a partir de mevalonato, en la biosíntesis de colesterol.

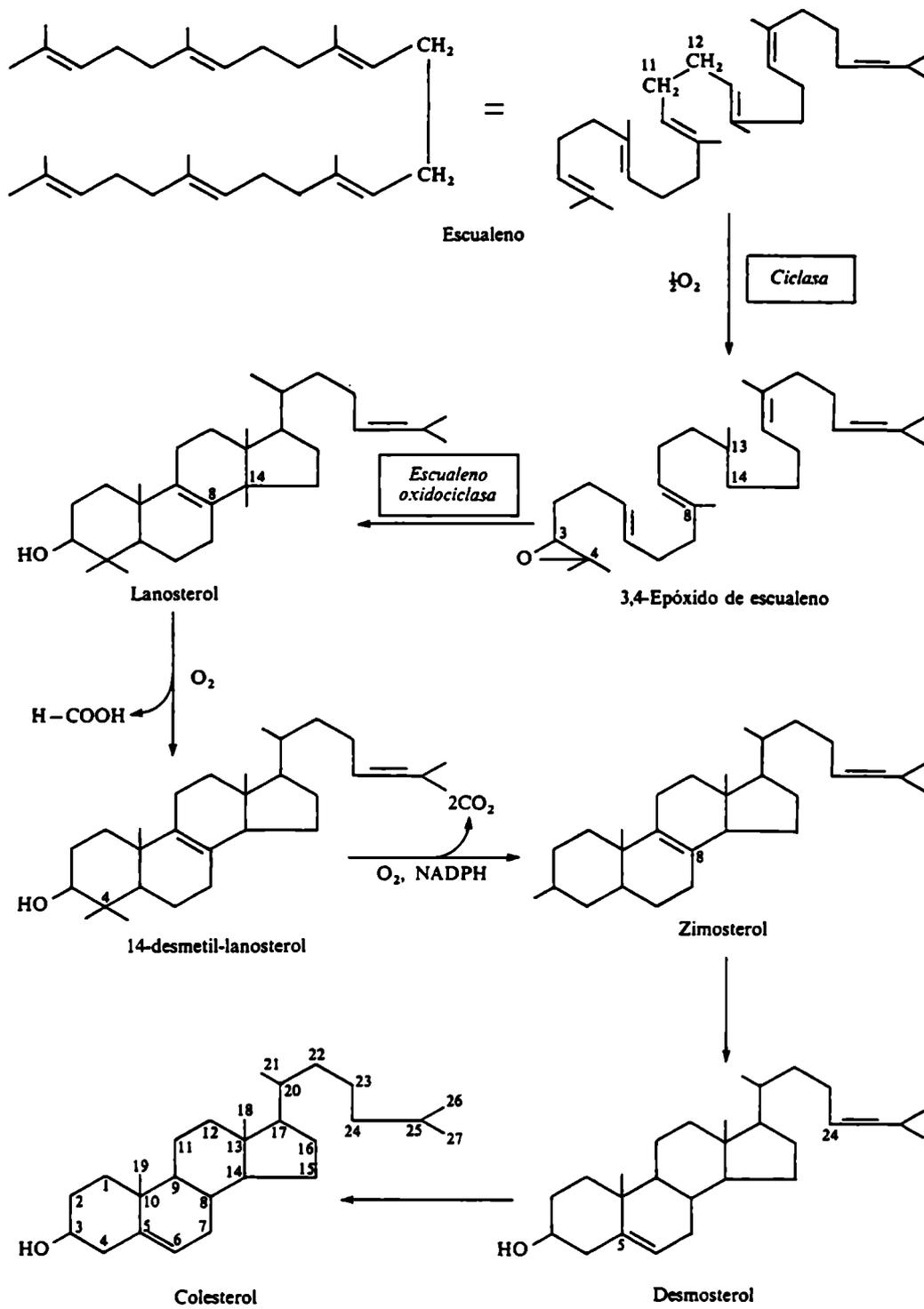


Figura I.4. Biosíntesis de colesterol a partir de escualeno.

I.C.1. CONTROL DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL. LA HMG-CoA REDUCTASA.

El punto clave de control de la síntesis de colesterol es la *HMG-CoA reductasa*, sobre la que el propio colesterol o sus metabolitos (por ejemplo, las formas oxigenadas de los esteroides, formadas por acción de hidroxilasas mitocondriales sobre el colesterol, o los ácidos biliares), o los dos, ejercen una inhibición indirecta, bien a través de un complejo sistema de control en cascada, bien modulando la velocidad de su síntesis o la de enzimas que controlan su degradación.

Dadas las importantes repercusiones patológicas que tiene en el organismo el desequilibrio en el balance de colesterol, vale la pena profundizar en la estructura y en el mecanismo de regulación de la enzima clave en el control de la colesterogénesis, la *HMG-CoA reductasa*.

Estructura de la reductasa

Estudios químicos de la proteína realizados por Laura Liscum, junto con el dato de la secuencia de nucleótidos, han revelado que la enzima de hámster es una proteína de PM= 97.092 y consiste en 887 residuos de aminoácidos (23, 29). Esta proteína está unida a la membrana de la envoltura nuclear y del retículo endoplásmico liso y consta de dos dominios (23, 30).

El primer dominio se halla orientado al lumen del retículo, comprende a la mitad aminoterminal de la molécula (~ 42.000 Da) y es extremadamente hidrofóbico. El segundo dominio, que se proyecta en el citosol, comprende la mitad carboxilo terminal de la molécula (~ 55.000 Da), es hidrofílico y contiene el sitio activo de la enzima. Esta mitad carboxilo terminal de la molécula puede ser liberada proteolíticamente desde la membrana, como un fragmento de 55.000 Da soluble en agua que retiene toda la actividad enzimática (23).

Usando una combinación de modelos por computadora y experimentos de proteólisis, se ha encontrado que la mitad amino-terminal de la HMG-CoA reductasa atraviesa la membrana del retículo endoplásmico 7 veces y contiene una cadena de carbohidratos rica en manosa ligada a la asparagina (23). Una estructura similar ha sido encontrada en la enzima de todas las especies eucariotas examinadas (31 - 35), excepto en *Arabidopsis*, en la cual el dominio hidrofóbico presenta sólo una región transmembrana (36). La razón por la cual la reductasa tiene esta compleja estructura hidrofóbica en su mitad amino-terminal es desconocida. Si bien este dominio no es requerido para la actividad catalítica de la enzima se sabe que está involucrado en la regulación de la degradación de la HMG-CoA reductasa como se describirá posteriormente. En cuanto al segundo dominio (citoplasmático) las predicciones sobre su estructura secundaria sugieren que este consiste en dos regiones alargadas dispuestas en "*β*-barril" rodeadas por hélices anfipáticas.

Mecanismos de regulación de la HMG-CoA reductasa

Se conocen tres formas de control de la *HMG-CoA reductasa*:

1. A largo plazo, mediante cambios en su concentración a nivel de síntesis o degradación.
2. Por variación en la fluidez de la membrana en que se encuentra anclada, de forma que la incorporación de colesterol u otros esteroides a la misma la distorsionan, y hacen que disminuya su actividad.
3. A corto plazo, por mecanismos de fosforilación y desfosforilación.

El control de la HMG-CoA reductasa a largo plazo se realiza a nivel de la transcripción y traducción de los genes que codifican su síntesis o la de las enzimas que controlan su degradación. En la figura I.5 se resumen los factores que controlan la actividad de la HMG-CoA reductasa a largo plazo, y el efecto que tienen sobre su síntesis y degradación, pero aún se desconocen los mecanismos precisos que

participan en cada una de estas formas de control (37, 38). La complejidad de esta regulación fue revelada primero a través del uso de potentes inhibidores de la reductasa presentes en hongos (ver "Inhibidores de la Síntesis de Colesterol"). Estos agentes, los cuales incluyen compactin y lovastatin (mevinolin) inhiben competitivamente a la enzima a concentraciones menores a 10^{-8} M. En cultivos de células ellos bloquean la síntesis de mevalonato y gatillan reacciones adaptativas que conducen a un incremento de 200 veces en la cantidad de reductasa en unas pocas horas (39, 40). Esta proteína inducida es inactiva en las células porque está bloqueada por el inhibidor, pero puede ser detectada por ensayos *in vitro* después que el inhibidor es removido por dilución o diálisis. Este incremento de 200 veces de la cantidad de reductasa es el efecto multiplicativo de cambios más pequeños que ocurren a tres niveles: inducción de la transcripción produciendo un incremento de ocho veces en el nivel de mRNA, cada mRNA es traducido a una velocidad cinco veces mayor, y las moléculas de enzima son degradadas cinco veces más lentamente (40).

El incremento de 200 veces de la cantidad de reductasa, ocasionado por el tratamiento de las células con compactin o lovastatin, puede ser revertido en pocas horas incubando a las células con grandes cantidades de mevalonato (10 mM) o con pequeñas cantidades de mevalonato (< 1 mM) conjuntamente con LDL de plasma (37, 39, 40). LDL sola suprime la enzima por sólo ocho veces. Estos hallazgos conducen al concepto de que HMG-CoA reductasa está controlada por varios mecanismos de regulación feedback. Fisiológicamente, la completa reducción en la actividad de la enzima requiere ambos, un esteroles que puede ser derivado desde LDL y un metabolito no esteroles que tiene que ser sintetizado desde mevalonato.

Recientes evidencias indican que el esteroles y el metabolito no esteroles actúan a diferentes niveles. Los esteroides reprimen activamente la transcripción ejerciendo su efecto a través de un corto segmento presente en el promotor del gen para la HMG-CoA reductasa denominado elemento regulador de esteroides-1 (SRE-1)(41).

Pero aún cuando los esteroides son saturantes, el mRNA de reductasa continúa siendo transcrito a un octavo de su velocidad máxima (40). Mientras que, la velocidad de traducción de este mRNA está determinada por la demanda celular de isoprenoides no esteroides. Cuando la producción de mevalonato está bloqueada por un inhibidor de la reductasa, el mRNA es eficientemente traducido aún en presencia de esteroides, pero cuando los requerimientos de no esteroides son satisfechos por la administración de mevalonato exógeno conjuntamente con esteroides, la traducción del mRNA de reductasa es reducida cinco veces (40). Resultados similares son obtenidos con inhibidores de reductasa en una línea mutante de células CHO con un defecto en HMG-CoA sintetasa que bloquea la síntesis de mevalonato (42).

Cuando se adiciona colesterol a células desarrolladas inicialmente en presencia de compactin y en ausencia de colesterol exógeno, la velocidad de degradación de las moléculas de HMG-CoA reductasa preformadas se incrementa 3 veces (43).

La función de la región transmembrana, estructuralmente compleja y altamente conservada, ha sido inicialmente oscura dado que tanto los sustratos como los productos de la enzima son hidrosolubles y solamente se necesita el dominio catalítico hidrosoluble para restaurar el normal crecimiento de una línea de células deficientes en HMG-CoA reductasa (44). Pero a diferencia de lo que pasa en la enzima completa, la degradación de esta enzima truncada no se acelera por la presencia de esteroides. La delección de dos o más secuencias del espacio transmembrana de la reductasa anula el recambio mediado por esteroides de la enzima nativa o de una enzima quimérica producida por una fusión de genes (45). De este modo se demuestra que los esteroides actúan a través del dominio transmembrana de la enzima.

Las evidencias actuales indican que la degradación acelerada de la reductasa requiere un isoprenoide no esteroide así como también un esteroide. En estudios realizados con células en las cuales se bloquea completamente la producción de

mevalonato por incubación con concentraciones muy elevadas de compactin (0,1 mM) (40) los esteroides no alcanzan a producir la máxima aceleración de la degradación de la reductasa; una mayor aceleración requiere la adición de mevalonato exógeno, presumiblemente para la incorporación en productos no esteroides.

En muchos experimentos, derivados oxigenados de colesterol, como 25-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol, son más de 100 veces más potentes que el mismo colesterol (46, 47). Estos esteroides, que son mucho más solubles en agua que el colesterol, alcanzan altas concentraciones en el citosol y esto puede ser la causa de su mayor potencia.

La gran potencia fisiológica del colesterol derivado de LDL puede ser atribuida a una proteína transportadora que une colesterol cuando este emerge de los lisosomas y lo escolta a los sitios regulatorios. Alternativamente, el colesterol liberado desde los lisosomas puede ser convertido en oxisteroides más activos (46). Se ha purificado una proteína que puede mediar las acciones regulatorias de los oxisteroides (48). Originalmente identificada por Kandutsch y otros colaboradores (49), esta proteína citosólica preferencialmente une oxisteroides que son los más potentes reguladores metabólicos. Esto, no obstante, no es una evidencia directa de que esta proteína participa en la regulación mediada por esteroides, y su rol metabólico debe ser aún establecido.

Evidencias genéticas indican que el colesterol derivado de las LDL y oxisteroides solubilizados en solventes utilizan un camino común para ejercer sus acciones regulatorias (50 - 52).

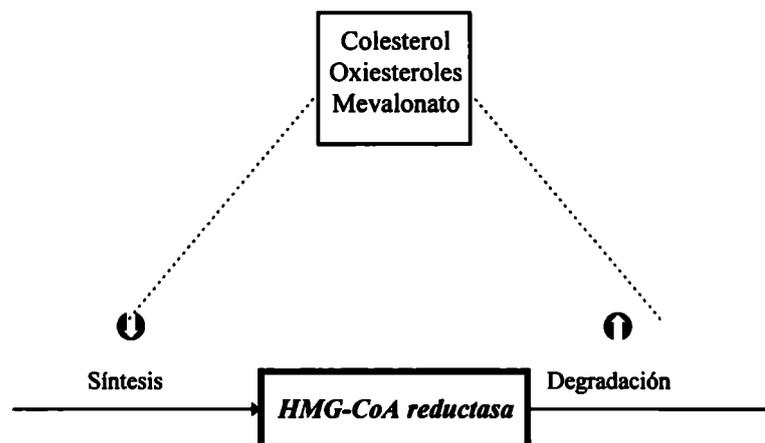


Figura I.5. Factores que controlan la actividad de la HMG-CoA reductasa a largo plazo modificando la velocidad de su síntesis o de su degradación.

El control a corto plazo de la HMG-CoA reductasa se conoce mejor, y se han descrito tres sistemas distintos de proteínas quinasa que modulan la fosforilación de la molécula, y facilitan así su inactivación (53, 54). Por acción de una fosfatasa, la enzima se desfosforila, pasando a su forma activa. En la figura I.6 se esquematizan los tres sistemas de control a corto plazo de la HMG-CoA reductasa. El primero consiste en una cascada formada por dos ciclos, uno que corresponde a la intervención de la reductasa quinasa y otro a la de la propia HMG-CoA reductasa. Esta cascada bicíclica es sensible a hormonas, de forma que la insulina facilita el proceso de la desfosforilación de la HMG-CoA reductasa y el glucagón su fosforilación. También es sensible al colesterol y al mevalonato, que facilitan la fosforilación, y por consiguiente la inactivación de la enzima. El lugar donde actúan estos moduladores sobre la cascada bicíclica difiere de unos a otros, y en algunos casos no se conoce con precisión.

El segundo sistema de control de la fosforilación de la HMG-CoA reductasa implica la participación de una *proteína quinasa C*, que es activada por el diacilglicerol formado a partir de los fosfatidil-inositoles, por los iones Ca^{2+} y los ésteres de forbol. Todos ellos, al activar a la *proteína quinasa C*, facilitan su acción estimulando la fosforilación de la HMG-CoA reductasa y, en consecuencia, su inhibición.

El tercer sistema de control por fosforilación de la HMG-CoA reductasa es dependiente de iones Ca^{2+} y de la proteína *calmodulina*, que activan a una proteína quinasa de bajo peso molecular (la *calmodulina quinasa*), que cataliza la fosforilación de la HMG-CoA reductasa.

De estos tres sistemas de control, el primero es el mejor conocido hasta la fecha, pero parece que los otros dos son también importantes, ya que constituyen los mecanismos por medio de los cuales muchas hormonas y señales extracelulares modulan la actividad de la HMG-CoA reductasa.

Cabe también señalar que el grado de fosforilación o desfosforilación de la HMG-CoA reductasa modifica su susceptibilidad para ser degradada por *endopeptidasas*, por lo que aquél determina no sólo la actividad de la enzima presente, sino también su cantidad. A su vez, el colesterol, al modular la fluidez de la membrana del retículo endoplasmático, donde se encuentra enclavada la enzima, puede cambiar la orientación de su dominio hidrofílico hacia el espacio citosólico, y con ello afectar también su grado de fosforilación.

La existencia de estos sistemas complejos y enormemente sensibles para controlar la síntesis de colesterol podría considerarse como una compensación metabólica que aporta la naturaleza, a la incapacidad de los mamíferos de degradar el colesterol, garantizando así la ausencia de errores en el control de su síntesis.

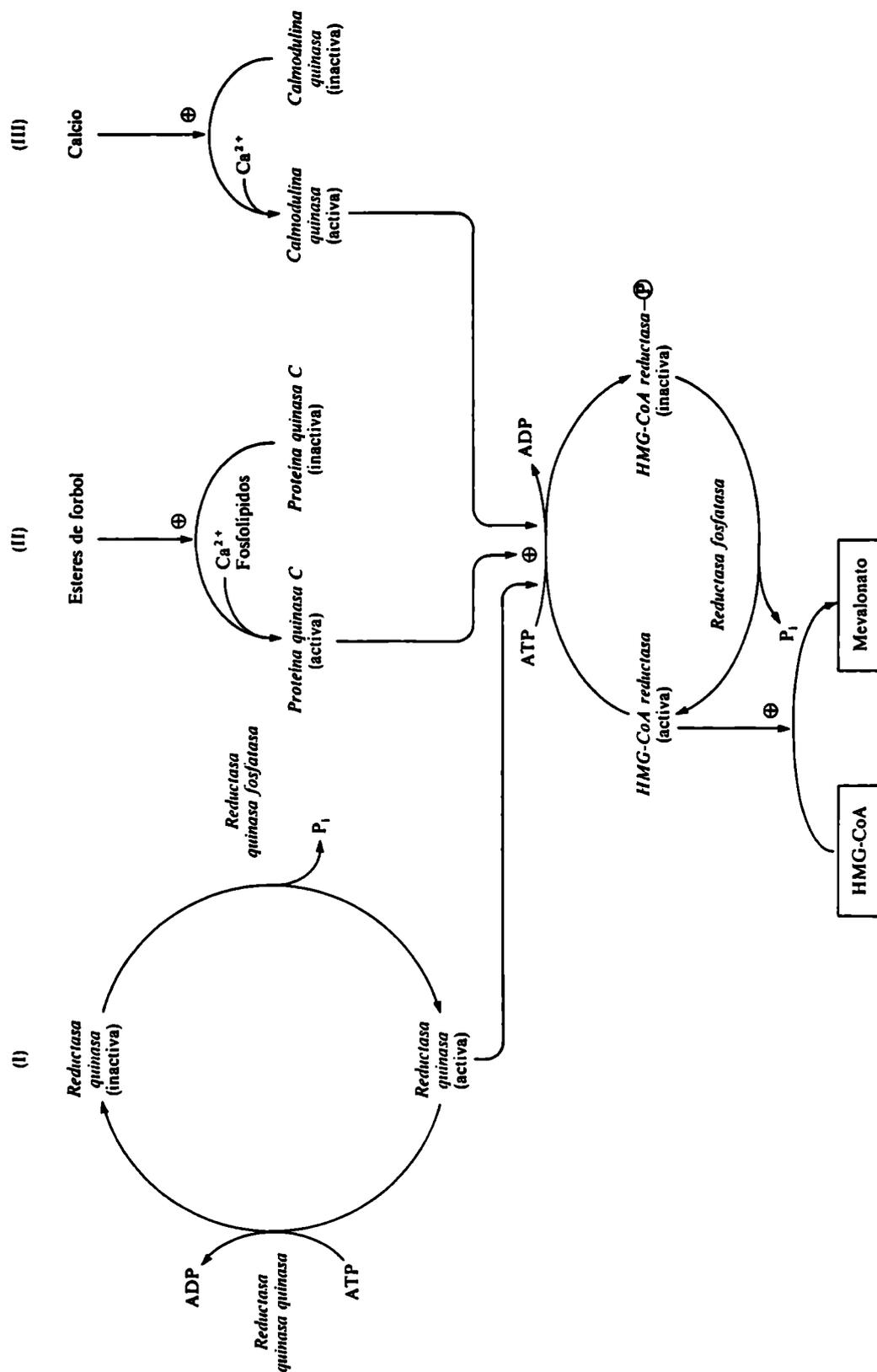


Figura 1.6. Representación de los tres sistemas en cascada conocidos para la modulación de la actividad de la *HMG-CoA reductasa* a corto plazo a través de su fosforilación y desfosforilación.

I.C.2. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL Y COLESTEROLEMIA.

El interés en el desarrollo de inhibidores de la biosíntesis de esteroides comienza en los años '50, cuando el rol del colesterol plasmático en la aterosclerosis resulta claro. La meta perseguida era obtener una droga que disminuya los niveles de colesterol plasmático por bloqueo de su síntesis endógena. Siendo la HMG-CoA reductasa la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de colesterol en animales fue el blanco para el desarrollo de drogas inhibitorias que permitan controlar la síntesis de este esteroide.

El objetivo de obtener una droga que disminuya el colesterol plasmático basada en la inhibición de la HMG-CoA reductasa se alcanzó con el descubrimiento de varios metabolitos fungales estrechamente relacionados, los cuales son genéricamente denominados 'statins'.

El primero de estos compuestos en ser aislado fue el mevastatin (formalmente conocido como ML-236B (55) y compactin (56)) obtenido de *Penicillium citrinum* y *P. brevicompactum*. Este fue seguido luego por un compuesto estrechamente relacionado, el lovastatin (formalmente conocido como monocolin K (57, 58) y mevinolin (59)). Posteriormente fueron adicionados a la lista el pravastatin (60) un producto de la oxidación bacteriana del mevastatin y el simvastatin (también conocido como sinvinolin y MK-733) aislado de *A. terreus*. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Fig. I.7, conjuntamente con otros dos inhibidores sintéticos de la reductasa muy activos y estructuralmente relacionados (61).

El primer statin que demostró ser un inhibidor de la HMG-CoA reductasa fue el mevastatin (62) y fue seguido por el lovastatin (59). Todos los statins mostrados en la Fig. I.7 son inhibidores competitivos de HMG-CoA reductasa y sus valores de K_i son los siguientes: mevastatin, 1,4 nM; lovastatin, 0,3 nM; pravastatin, 2,3 nM; simvastatin, 0,12 nM (63).

Examinando las estructuras de los inhibidores de la reductasa se encuentra que tienen una mitad que se parece a la mevalonolactona o al anión del ácido mevalónico, cuyas estructuras se muestran en la base de la Fig. I.7 para que puedan ser comparadas. Puede notarse que bajo condiciones ácidas el mevalonato pierde una molécula de agua y cierra un anillo para formar la δ -lactona, mevalonolactona; en condiciones alcalinas la situación anterior se revierte y se abre el anillo de la mevalonolactona para formar el anión del ácido mevalónico. Esto también ocurre con los statins. Por lo tanto cuando son administrados oralmente, existen en el estómago como lactonas y en el medio alcalino del intestino delgado en la forma de anillo abierto. En esta forma aniónica es como los statins son absorbidos, transportados a los distintos tejidos e inhiben activamente a la HMG-CoA reductasa.

La potencial utilidad de los statins en la disminución de los niveles de colesterol sérico ha sido cuidadosamente demostrada. Mevastatin ha mostrado tener este efecto en perros y luego en pacientes humanos con hipercolesterolemia (64). El lovastatin causa una marcada reducción en los niveles de colesterol sérico en sujetos normales (65) y ha demostrado ser igualmente efectivo en ensayos con individuos que padecen hipercolesterolemia familiar heterocigota (66) y no familiar (67). Esta reducción se produce tanto en el colesterol total como en el LDL-colesterol (66, 68).

La disminución del LDL-colesterol causada por el lovastatin otorgó la clave del mecanismo por el cual los inhibidores de la HMG-CoA reductasa disminuyen el colesterol plasmático. Como mencionáramos, las LDLs y el colesterol que ellas llevan son removidos de la sangre por el hígado y tejidos extrahepáticos; siendo el hígado particularmente importante porque es responsable del 60-80% del total removido (69). La principal ruta por la cual las LDLs son tomadas por los hepatocitos es vía receptores específicos de LDL (70) los cuales están presentes sobre la superficie externa de la membrana plasmática. La velocidad de síntesis de

receptores de LDL es inversamente proporcional a la cantidad de colesterol en las células (71). La consecuencia de esto es que cualquier agente que reduce el contenido de colesterol de los hepatocitos y otras células puede estimular la síntesis de receptores para LDL. Este incremento de los receptores para LDL en la membrana plasmática de esas células puede luego incrementar la velocidad de captación de las LDL desde la sangre y entonces reducir los niveles de colesterol sérico. Claramente los statins, siendo inhibidores de la HMG-CoA reductasa, son unos de estos agentes que disminuyen el contenido de colesterol de las células bloqueando su síntesis.

Era de esperar que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa tuviesen efectos adversos sobre los pacientes por dos razones. Primeramente, ellos bloquean la síntesis de colesterol el cual es requerido para la formación de membranas y es el precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas. En segundo lugar, la HMG-CoA reductasa es también requerida para la biosíntesis de varios terpenoides como ubiquinona, un componente de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y dolicol, el cual está involucrado con la biosíntesis de glicoproteínas (ver "Destinos alternativos del mevalonato"). Sin embargo, si bien algunos efectos colaterales tóxicos han sido observados en animales cuando reciben dosis 50 veces mayor que la usada en el tratamiento de humanos (la cual es 20-80 mg por día de lovastatin) y efectos colaterales menores se han reportados en pacientes tratados con lovastatin (dolor de cabeza, insomnio pasajero, vagos desordenes abdominales), estos compuestos han probado estar marcadamente libres de efectos colaterales adversos en el uso clínico (63).

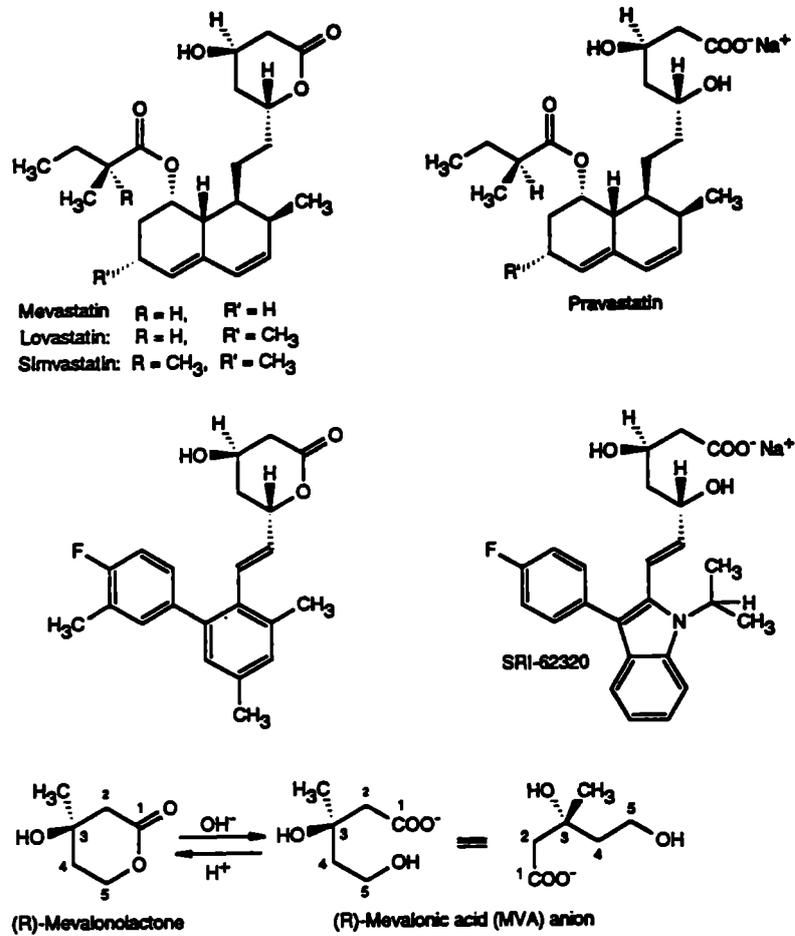


Figura I.7. Estructura de los 'statin', inhibidores de la HMG-CoA reductasa, y su relación con ácido mevalónico y su lactona.

I.D. DESTINOS ALTERNATIVOS DEL MEVALONATO.

Si bien el colesterol es el producto mayoritario del metabolismo intracelular del mevalonato, algunos intermediarios isoprenoides de la síntesis de este esteroide son precursores activados de diversas biomoléculas con importantes roles biológicos como: ubiquinona, dolicol e isoprenoides covalentemente unidos a proteínas y tRNAs.

De modo que, puede considerarse que la biosíntesis de colesterol forma parte de una vía muy ramificada denominada en su conjunto: "Vía del mevalonato".

Según puede observarse el principal punto de ramificación de la Vía del mevalonato se encuentra a nivel del farnesil pirofosfato (FPP), siendo éste el sustrato común para las enzimas que catalizan el primer paso específico en la biosíntesis de colesterol, dolicol, ubiquinona y proteínas isopreniladas (Figura I.8).

El principal lugar de síntesis de FPP en células eucarióticas es la fracción citoplasmática, pero esta actividad está también presente en otros compartimientos celulares: matriz mitocondrial (72), peroxisomas (73) y microsomas (74).

La enzima *cis*-preniltransferasa media la adición secuencial de unidades IPP en *cis*, comenzando con la adición de IPP a todo-*trans*-FPP (75, 76). Un número de subsecuentes adiciones de IPP resulta finalmente en la formación de una familia de poliprenilpirofosfatos con largas cadenas α -insaturadas que luego de sufrir un cierto número de reacciones son transformadas en dolicol (77). La biosíntesis de este alcohol de cadena larga, si bien es particularmente importante en microsomas donde desempeña un rol central en la síntesis de glicoproteínas, también se ha detectado en peroxisomas (78).



Figura I.8. Organización de las enzimas del principal punto de ramificación de la "Vía del Mevalonato".

En células eucariotas, largas cadenas de todo-*trans* poliisoprenoides pirofosfato son producidas por la enzima *trans*-preniltransferasa. En células animales la función más importante o exclusiva de estos todo-*trans* poliisoprenoides es la de construir la cadena lateral de la ubiquinona.

Originalmente se creía que la ubiquinona estaba presente exclusivamente en la membrana mitocondrial interna, donde su única función es la de participar como un componente redox de la cadena respiratoria mitocondrial. Durante los últimos años este concepto se modificó, dado que la ubiquinona ha sido encontrada en todas las membranas celulares investigadas (79). Además, ahora está bien establecido que la ubiquinona tiene una función adicional como antioxidante endógenamente producido siendo el ubiquinol, la forma reducida de la ubiquinona, el antioxidante activo (80). Las células animales contienen 10 veces más ubiquinona que α -tocoferol (vitamina E) y la célula utiliza preferentemente a la primera como antioxidante (81).

Estudios realizados en hígado de rata revelan que la *trans*-preniltransferasa microsomal (82) se encuentra presente en la superficie del RE liso y rugoso y libera su producto al sistema RE-Golgi, donde es utilizado para la biosíntesis de ubiquinona (83). Mientras que, en mitocondrias esta enzima se encuentra asociada a la membrana mitocondrial interna (72).

Investigaciones recientes han establecido que todas las células eucariotas contienen un número grande y variable de proteínas isopreniladas (84). Si bien algunas de estas proteínas son modificadas con grupos farnesilo provenientes del FPP, la mayoría de ellas presentan restos geranil-geranil (C_{20}) unidos covalentemente. El hallazgo de que el mevalonato puede ser utilizado para la geranilgeranilación de proteínas por la fracción citosólica de varias fuentes distintas indica indirectamente que una GGPP sintetasa (GGPS) está presente en citosol (85). La síntesis de todo *trans*-GGPP en células animales ha recibido en los últimos tiempos gran atención debido a que la isoprenilación de proteínas con

GGPP ha pasado a ser un proceso regulatorio muy importante observado frecuentemente.

A través de la acción de una proteína:prenil transferasa específica, se establece una unión tioéter entre el isoprenoide donador (en la forma pirofosfato) y un residuo de cisteína C-terminal en la proteína aceptora (38, 86 - 88).

Entre las proteínas preniladas más ampliamente estudiadas se distinguen: proteínas *Ras*, lamininas nucleares, subunidad γ de proteínas G heterotriméricas y proteínas *Rab*.

Las p21^{ras} son una familia de proteínas de 21 KDa (codificadas por los genes *ras*) que unen nucleótidos de guanina y presentan actividad GTPasa intrínseca (89). Estas proteínas regulan el crecimiento, proliferación y diferenciación de células eucarióticas cuando están unidas a la superficie interior de la membrana plasmática (90 - 95). La activación de los genes *ras* normales por simples mutaciones puntuales los convierte en su forma oncogénica que se traducen en proteínas p21^{ras} alteradas que han perdido su actividad GTPasa (oncoproteínas) conduciendo a una división celular descontrolada (96 - 98). Las mutaciones de los genes *ras* juegan un importante rol en el desarrollo de cánceres humanos (89) y la asociación de las oncoproteínas p21^{ras} con la superficie interna de la membrana plasmática es requerida para su actividad transformante (99, 100). La farnesilación es identificada como el paso crítico para la asociación a membrana y por lo tanto indispensable para que las p21^{ras} puedan desempeñar su actividad transformante (101 - 103).

La isoprenilación muestra estar involucrada con la capacidad de unión a membrana no sólo de las p21^{ras} sino también de muchas otras proteínas. Proteínas-G son requeridas para la traducción intracelular de señales entre receptores y enzimas efectoras. En algunos casos una o dos de las subunidades de estas proteínas heterotriméricas son isopreniladas y esta modificación es requerida para la asociación del complejo funcional con la membrana. La prenilación de lamininas

nucleares es requerida para el ensamblaje apropiado de estas proteínas en la lámina nuclear y también para permitir a la laminina B permanecer asociada con vesículas derivadas de la membrana nuclear durante la mitosis (104). El transporte intracelular vesicular de proteínas desde RE-Golgi a la membrana plasmática y otras organelas y viceversa es un proceso activo en algunas células. Proteínas *rab* isopreniladas están involucradas a varios niveles en esta maquinaria de transporte. Si se impide la prenilación de estas proteínas, el transporte vesicular puede ser detenido.

Recientemente se ha encontrado que la isoprenilación puede también ser importante para las interacciones directas proteína-proteína (105 - 107).

Algunas células tratadas con mevinolin acumulan proteínas precursoras no preniladas las cuales pueden ser preniladas de manera insensible a cicloheximida cuando mevalonato marcado es adicionado al medio (108, 109). Para inhibir la prenilación las células deben ser expuestas a un nivel de mevinolin 500 veces mayor que el requerido para inhibir completamente la síntesis de colesterol. De modo que, esto sugiere que los isoprenoides formados en presencia de estos inhibidores son utilizados preferencialmente para la prenilación de proteínas antes que para la síntesis de colesterol.

I.E. ROL DE LA COLESTEROGÉNESIS Y SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN LA REPLICACIÓN DEL DNA Y CRECIMIENTO CELULAR.

En los últimos años se han aportado evidencias de que el colesterol, e indudablemente otros isoprenoides, juegan un rol crítico y esencial en el crecimiento de células eucarióticas, con muy pocas excepciones.

Síntesis de colesterol y crecimiento celular

La primera evidencia de la relación entre síntesis de colesterol y crecimiento celular fue aportada por Srere, Chaikoff, y Dauben (110) quienes encontraron que tejidos de rápido crecimiento como cerebro de rata recién nacida, sintetizan activamente colesterol desde fragmentos de dos carbonos, mientras que en cerebro adulto, el cual presenta un recambio celular pequeño, la colesterogénesis “de novo” se encuentra a velocidades muy bajas. Esta observación anticipa algunos estudios subsiguientes que demuestran que existe, en general, una excelente correlación entre velocidad de replicación celular y velocidad de síntesis de colesterol.

Tejidos que proliferan rápidamente como intestino tienen altos niveles de síntesis de colesterol y actividad HMG-CoA reductasa. En contraste, un órgano como riñón, el cual experimenta solamente un muy bajo recambio celular, está virtualmente exento de síntesis de colesterol y tiene muy pequeña actividad HMG-CoA reductasa (8, 111 - 113). La única excepción a esta generalización es el hígado adulto, el cual tiene un bajo recambio celular, pero activa síntesis de colesterol. Se asume que como el hígado es la principal fuente de colesterol plasmático, la colesterogénesis “de novo” en el hígado es requerida primariamente para su función de exportación. Consistente con esta correlación entre la proliferación celular y la actividad de la vía biosintética de colesterol, la rápida regeneración del hígado que sigue a una hepatectomía parcial está caracterizada por una velocidad muy alta de síntesis de colesterol (114).

La correlación entre proliferación celular, y actividad HMG-CoA reductasa fue también demostrada en varios sistemas de cultivos de tejidos. Chen, Heninger, y Kandutsch (115) primeramente demostraron que linfocitos de ratón estimulados por fitohemaglutinina sufren un incremento de 6 veces en la incorporación de acetato en colesterol 24 horas antes de que las células entren en la fase S del ciclo celular. Huneeus, Wiley, y Sipertein (116) han demostrado que, la liberación de células de riñón de hámster (BHK-21) desde un doble bloqueo con timidina, es seguida por un incremento en la actividad de HMG-CoA reductasa que precede a la primera duplicación celular. Habenicht, Glomset, y Ross (117) demostraron un incremento similar en la HMG-CoA reductasa y en la síntesis de colesterol en fibroblastos de ratón y en células de músculo liso siguiendo a la estimulación con factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Requerimientos de colesterol en el crecimiento y proliferación celular

El colesterol es componente de las membranas lipoproteicas de núcleo, mitocondrias, así como también de la membrana plasmática. No es sorprendente entonces, que una provisión de colesterol sea requerida para la proliferación de membrana que acompaña al crecimiento celular.

Goldstein y Brown (118), y más recientemente Witte y col. (119), demostraron un incremento de los receptores para LDL en células experimentando proliferación, sugiriendo que muchas células pueden satisfacer al menos algunos de sus requerimientos de colesterol por un incremento de la captación de LDL ricas en colesterol. Por otra parte, cuando no existe colesterol exógeno disponible, la síntesis de mevalonato está incrementada, y la provisión de colesterol, como así también de otros isoprenoides, es entonces mantenida. De modo que, la prueba más crítica de un verdadero requerimiento de colesterol para el crecimiento celular necesita de un método de inhibición específica de la producción de mevalonato en ausencia de una provisión de colesterol exógeno.

La primera evidencia de que la inhibición de la síntesis de colesterol puede inhibir el crecimiento celular fue provista por Chen, Kandutsch, y Waymouth (120), quienes demostraron que el tratamiento de células L de ratón con 25-hidroxi o 20-hidroxicolesterol, compuestos que inhiben la reductasa, bloquea el crecimiento y proliferación de estas células. Brown y Goldstein (121) llevaron adelante experimentos similares y notaron que 1-2 días de tratamiento con algún esteroles oxigenado reduce mucho la proliferación celular. Subsiguientemente, los estudios de Goldstein, Helgeson, y Brown (122) y de Kaneko, Hazama-Shimada, y Endo (123) mostraron que el tratamiento de 6 a 9 días con compactin, un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa muy potente, también previene la proliferación celular en sistemas de cultivos de tejidos.

Brown y Goldstein (121), Kandutsch y Chen (124), y Cornell y col. (125) demostraron que la adición de mevalonato o colesterol puede revertir la inhibición de la proliferación celular ocasionada por los esteroides oxigenados. Mientras que, Kaneko y col. (123) hacen la importante observación de que, aún en presencia de colesterol, es necesaria la adición de mevalonato para restaurar la proliferación de células tratadas con compactin, una observación que ha sido posteriormente confirmada por Brown y Goldstein (37). Estos dos últimos reportes indican que otros productos isoprenoides del mevalonato son probablemente también requeridos para el crecimiento celular.

Rol de los isoprenoides en la síntesis de DNA

Huneus, Wiley y Siperstein son quienes destacan por primera vez la posibilidad de que la producción de ácido mevalónico, además de servir como un precursor para satisfacer los requerimientos de colesterol estructural en el crecimiento celular, podría regular la proliferación celular por jugar un rol directo en la replicación del DNA. Realizan experimentos con el objeto de examinar un posible rol agudo del mevalonato en la iniciación de la replicación del DNA y determinar si

este efecto del mevalonato es independiente de su función como precursor del colesterol (116). Los resultados demostraron que existe un aumento considerable en HMG-CoA reductasa justo antes de cada replicación del DNA en la fase S. Esta observación sugiere que la HMG-CoA reductasa podría tener una función aguda en la replicación del DNA. De hecho, cuando la actividad HMG-CoA reductasa se bloquea por tratamiento con compactin, el incremento normal de la síntesis de DNA durante la fase S se previene. Significativamente, la reiniciación de la replicación del DNA por la adición de mevalonato es rápida, ocurriendo pocos minutos después de esta adición a células inhibidas por compactin. Mas aún, en algunos casos, un exceso de mevalonato resulta en una elevación de la síntesis de DNA aún en células control. Por el contrario, el colesterol, adicionado en cantidades suficientes para causar una significativa acumulación intracelular del mismo, no tiene efectos sobre la síntesis de DNA en células tratadas con compactin. Es notable que, en presencia de colesterol, este efecto del agotamiento y restitución del mevalonato es específico para la replicación del DNA en fase S. Este dato provee la primer evidencia de que, independientemente de su función en la síntesis de colesterol, el mevalonato sintetizado por HMG-CoA reductasa juega un rol importante en la iniciación de la replicación del DNA.

Otros investigadores han demostrado también que el vaciamiento del mevalonato puede inhibir la síntesis de DNA por un mecanismo que es independiente de la colesterogénesis, y que la inhibición de la síntesis de DNA por tratamiento con compactin o lovastatin puede ser revertida por la adición de mevalonato, pero no por colesterol (117, 126 - 131).

El rol dual del mevalonato en el ciclo celular se logró identificar utilizando dos inhibidores de la síntesis de colesterol, TMD (trimetil decal), un inhibidor específico de la síntesis de colesterol que actúa más allá del mevalonato a nivel de la ciclación de escualeno, y compactin, que actúa inhibiendo la síntesis de mevalonato (132). Con esto, pudo ser demostrado que el colesterol por un lado es

requerido para el crecimiento celular al principio de la fase G₁ del ciclo celular, mientras que los requerimientos de mevalonato independientes del colesterol no son detectables en G₁ y parecen estar localizados en la interfase G₁ -S del ciclo celular.

Estos hallazgos indican que el mevalonato desempeña al menos dos funciones en el crecimiento y proliferación celular (Fig. 1.9.). Primero, como se describe antes, el mevalonato puede, cuando las condiciones lo requieren, proveer cantidades suficientes de colesterol estructural para el mantenimiento de la síntesis de membrana necesaria para el crecimiento celular. La segunda función del mevalonato, independiente de su rol como precursor del colesterol, es el de desempeñar un rol esencial en la iniciación de la replicación del DNA. Este descubrimiento ha revelado una inesperada conexión directa entre la vía de colesterogénesis y la replicación del DNA.

El mecanismo exacto por el cual un producto del mevalonato distinto del colesterol puede iniciar la replicación del DNA permanece sin ser determinado. Productos finales como ubiquinona (133) o dolicol no son buenos candidatos porque las células parecen tener almacenado un pool de estos metabolitos suficiente como para permitir la realización de una vuelta de división celular. Además, la molécula candidata debe ser sintetizada en una fase precisa del ciclo celular para permitir la síntesis de DNA. Una pista surge con el descubrimiento de que, como ya se mencionara, el mevalonato es también requerido para la modificación post-traducciona de un gran número de proteínas que desempeñan funciones críticas en el crecimiento y proliferación celular. El hecho de que sólo el mevalonato pueda revertir la inhibición de la replicación del DNA y el arresto de las células en G₁ ocasionados por el lovastatin o compactin sugiere la posibilidad de que se requiera la acción de una o más proteínas isopreniladas para mantener la capacidad proliferativa de las células en la fase G₁. De modo que, la inhibición de la prenilación ocasionada por el statin inactivaría a estas proteínas. La adición de

mevalonato las reactiva y esto induce a las células a reiniciar su paso a través del ciclo celular de una manera sincrónica.

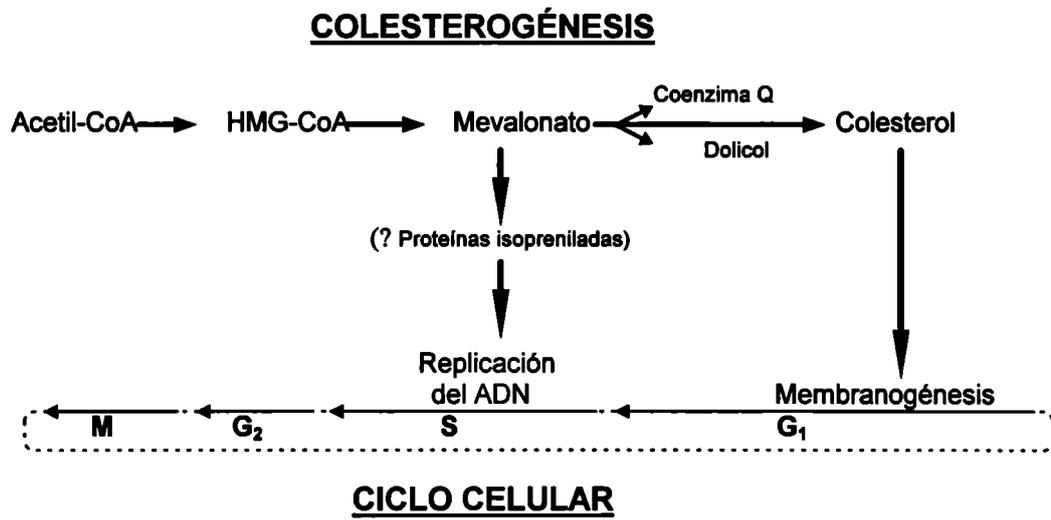


Figura I.9. Rol de la colesterogénesis en el ciclo celular y la síntesis de ADN.

I.F. OBJETIVOS.

En los ítems anteriores se ha establecido claramente que el hígado es el órgano central hacia el cual convergen el colesterol proveniente de la dieta y el sintetizado endógenamente y desde donde este esteroles es eliminado a través de la bilis como colesterol libre o previa transformación en ácidos biliares. Una alteración del flujo neto de colesterol a través del hígado ocasiona un cambio de la velocidad de síntesis de colesterol por modulación en la actividad de la HMG-CoA reductasa y una modificación de la concentración plasmática de las LDL que se traduce en una alteración de la biodisponibilidad de colesterol exógeno para los tejidos extrahepáticos.

También se mencionó que, si bien parte del colesterol requerido para la síntesis de nuevas membranas es obtenido por captación de las LDL plasmáticas, este esteroles y otros productos finales que desempeñan importantes roles en el crecimiento y proliferación celular son sintetizado endógenamente a partir de acetil CoA en la vía del mevalonato siendo la HMG-CoA reductasa la enzima limitante de la velocidad de esta vía.

Considerando el rol central desempeñado por el hígado en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol corporal, fundamentalmente a través de la modulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa y del receptor para LDL, y atendiendo a la estrecha correlación que existe entre la actividad de la reductasa y el crecimiento y proliferación celular, los objetivos generales planteados en el desarrollo de esta tesis fueron:

- 1- Analizar el efecto de la presencia de un tejido muy proliferativo, como lo es un tumor, sobre la colesterolemia, la actividad de la HMG-CoA reductasa y el contenido de colesterol hepático del animal huésped.

- 2- Estudiar el efecto de un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa, sobre el crecimiento tumoral y la homeostasis del colesterol hepático y tumoral.

Para ello se utilizó un carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano (HLMC) desarrollado en ratones inmunodeprimidos “nude”.

- 3- Estudiar el mecanismo de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa de la línea tumoral hepática humana Hep G2 y de este modo evaluar su utilidad como un modelo de estudio *in vitro* que pueda compararse al hepatocito normal.
- 4- Observar el efecto del etanol, compuesto conocido por alterar la homeostasis de los lípidos y ocasionar un daño hepático progresivo, sobre: el crecimiento celular, la actividad HMG-CoA reductasa y el metabolismo del colesterol de células Hep G2.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

II.A. MATERIALES UTILIZADOS.

II.A.1. DROGAS RADIATIVAS.

Se utilizaron los siguientes compuestos radiactivos:

1. Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A, DL-3-[glutaril-3-¹⁴C]- (sol. agua)
59,90 mCi/mmol
99 % puro
New England Nuclear Corp., Boston MA
2. Mevalonolactona, RS-[5-³H(N)]- (sol. etanol)
33,00 Ci/mmol
99 % puro
New England Nuclear Corp., Boston MA
3. Ácido acético, sal sódica [1-¹⁴C]- (sol. etanol)
54,0 mCi/mmol
99% puro
New England Nuclear Corp., Boston MA
4. Timidina, [metil-³H]- (sol. agua)
20,0 Ci/mmol
98,8% puro
New England Nuclear Corp., Boston MA
5. Colesterol, [1,2-³H(N)]- (sol. etanol)
51,0 Ci/nmol
99% puro
New England Nuclear Corp., Boston MA

II.A.2. DROGAS NO RADIATIVAS.

Solventes:

Acetona

Benceno

Cloroformo

Etanol absoluto

Éter de Petróleo

Metanol

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

Sustancias para centelleo líquido:

Fluorescente primario: 2,5-difeniloxazol (PPO)

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

Ambas drogas se adquirieron a Packard Instrument Company, Illinois, USA.

Fases para cromatografía gas líquido:

En cromatografía de esteroides se utilizó como fase estacionaria el relleno "SE-30" en Supelcoport 80 a 100 mallas.

Esta fase fue adquirida a Supelco Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.

Elementos para cromatografía en capa fina:

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

Estándares:

Albúmina sérica bovina (fracción V)

β -sitosterol

Colesterol

Lanosterol

Escualeno

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

Cofactores enzimáticos:

NADP⁺ fue adquirido a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.

Enzimas:

Glucosa-6-P deshidrogenasa (570 unidades/mg) fue adquirido a Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.

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

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

Gases:

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

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

Drogas varias:

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

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

Glicerol y aminoácidos: Carlo Erba, Milán, Italia.

Vitaminas: Abbott Lab., Argentina.

Brij 96, DTT (ditiotreitól), HMG-CoA (DL-3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etanosulfónico) y glucosa-6-fosfato: Sigma Chem. Comp., St. Louis, U.S.A.

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

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

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

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

II.B. METODOLOGÍA.**II.B.1. METODOLOGÍA ESPECÍFICA UTILIZADA PARA TUMOR HUMANO HETEROTRANSPLANTADO.****II.B.1.a. Mantenimiento de los animales.**

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones NIH hembras portadores del genotipo nu/nu. Se trata de ratones mutantes sin pelo que fueron observados por primera vez en 1962 por el Dr. N.R. Grist en Glasgow, Escocia. La genética de la mutación fue descrita por S.P. Flagan (134) quien confirmó que la falta de pelo está determinada por un gen autosómico recesivo al cual denominó nude (desnudo),

símbolo *nu*. En 1968 el Dr. E.M. Pantelouris descubrió la condición atímica de los nude (135). En cuanto a la asociación de la condición atímica y la ausencia de pelaje, la evidencia acumulada sugiere que se trata de una mutación con múltiples efectos o *Pleiotropismo*. La asociación de estos rasgos facilita el manejo de la colonia de animales permitiendo distinguir la progenie homocigota sin necesidad de un extenso monitoreo.

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

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

Los animales fueron alimentados “ad libitum” con una dieta standard de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma (composición detallada en Tabla II.1). Se les permitió libre acceso al consumo de agua acidulada (pH: 3) esterilizada en autoclave.

Tabla II.1.**Composición de la dieta suministrada a ratones "nude"**

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

Composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en la dieta

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

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

II.B.1.b. Desarrollo y mantenimiento del tumor humano en ratones “nude”.

La condición atímica de los ratones “nude” conduce a un profundo deterioro de la inmunidad mediada por células lo cual permite la aceptación de heterotransplantes (136, 137) y transforma a estos animales en huéspedes ideales para el desarrollo de líneas tumorales humanas. De hecho desde que, en 1969, se llevó a cabo el primer heterotransplante exitoso de un tumor de colon humano obtenido por cirugía (138), la lista de tumores humanos desarrollados y transplantados seriadamente en ratones “nude” es muy amplia.

En este trabajo se utilizó un tumor de pulmón humano desarrollado en ratones “nude” por el Dr. Osvaldo Mercuri en 1982. El tumor sólido fue obtenido por cirugía practicada en un hospital local e implantado en el espacio interescapular de ratones NIH “nude” observándose desarrollo local seis meses después del implante primario. Los estudios histopatológicos e inmunoquímicos del material implantado y el análisis de las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico (Figura II.1) llevaron a los patólogos al diagnóstico de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano (HLMC: human lung mucoepidermoid carcinoma): Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología (CIE-O) 8430/3 (139). Los tumores obtenidos del primer implante fueron transplantados seriadamente y los estudios histológicos realizados confirman que se conservan las características originales del tumor a lo largo de las distintas generaciones (Figura II.2).

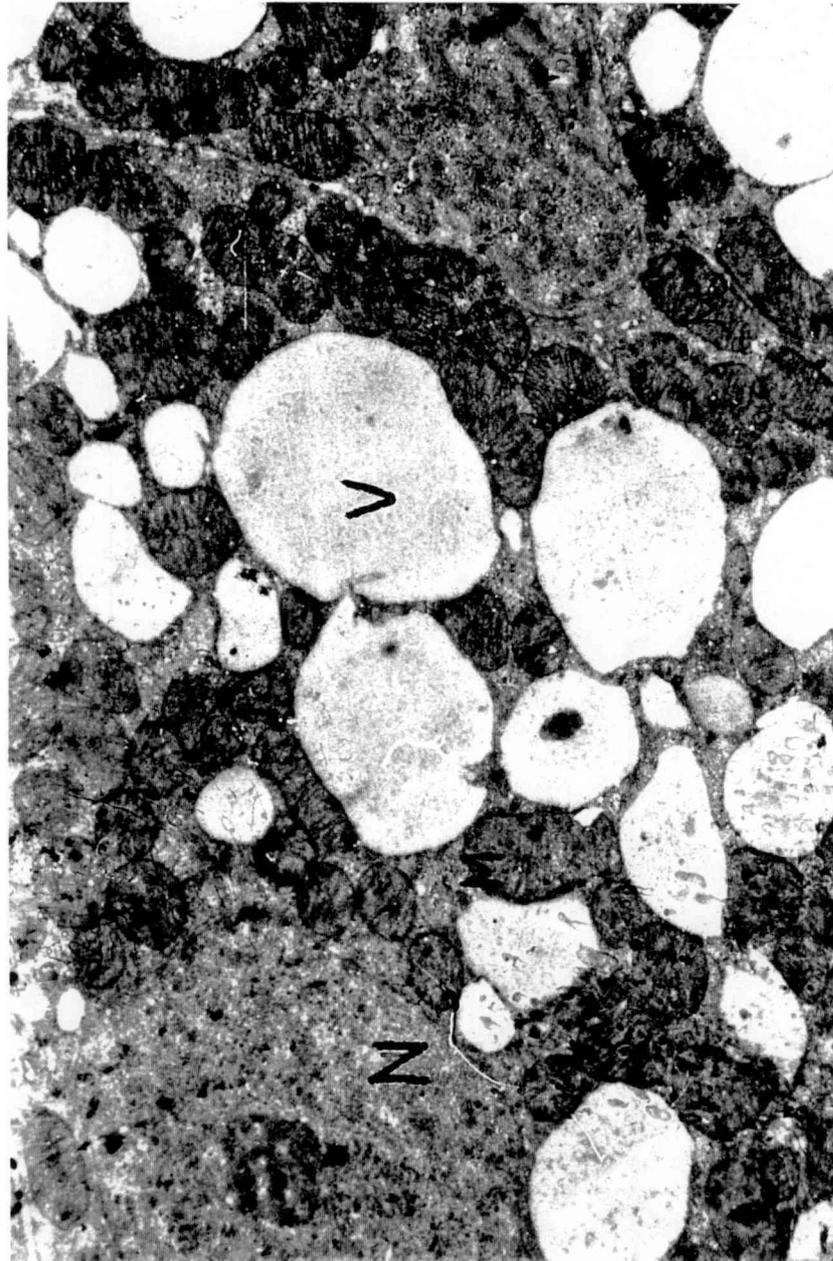


Figura II.1. Microscopía electrónica de células del tumor sólido obtenido por cirugía que fue implantado en ratones “nude”. Se observan claramente: núcleo (N), mitocondrias (M) y vacuolas (V).

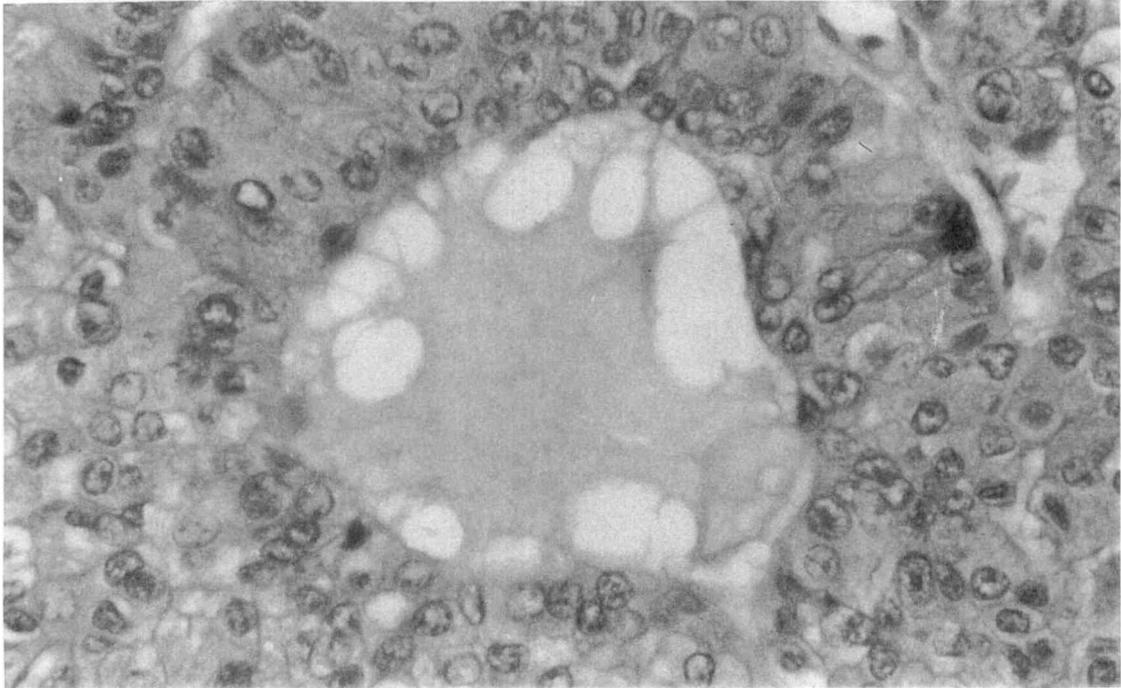


Figura II.2. Microfotografía tomada durante el estudio histopatológico de material proveniente del repique número 44 del HLMC en ratones “nude”.

Se observa una luz glandular neoplásica con secreción de aspecto mucíparo, homogéneo y con vacuolas de reabsorción co-lindantes con el epitelio glandular.

Las células neoplásicas presentan anisocitosis y anisocariocis con un aspecto diferenciado en relación a su histogénesis. El citoplasma es homogéneo, acidófilo con microvacuolas. Llama la atención la carioteca densa, el núcleo de cromatina laxo con algunos nucléolos prominentes.

El estudio fue realizado gentilmente por la Dra. Amada Segal-Eiras y la Dra. María Virginia Croce.

El HLMC fue mantenido por repiques sucesivos en ratones nude, realizados cada dos meses. Para realizar cada uno de los repiques de mantenimiento el tumor fue removido quirúrgicamente, se lavó con solución fisiológica (SF) estéril y se eliminaron regiones necrosadas (observadas frecuentemente en el centro de la masa tumoral probablemente por insuficiente vascularización). Posteriormente se adicionó SF estéril, se cortó el tumor con tijera y se disgregó el tejido haciéndolo pasar por una malla de acero de 1 mm² obteniéndose una suspensión de tejido conteniendo aproximadamente 300 mg de tejido/ml.

Finalmente, cada animal fue inoculado subcutáneamente con 0,2 ml de suspensión de tejido.

En todos los casos en los que el implante resultó exitoso el desarrollo de tumores pudo ser reconocido entre los 25 y 30 días siguientes a la inoculación (Figura II.3). El tumor incrementó progresivamente su tamaño, llegando a alcanzar dimensiones considerables (mayores a los 15 g). El tiempo de duplicación en masa registrado en fase logarítmica de crecimiento es de 8-10 días.

II.B.1.c. Medida de las dimensiones tumorales.

Cuando los tumores implantados se tornaron palpables fueron medidos al menos dos veces por semana con calibres y el volumen tumoral fue calculado usando la fórmula de un elipsoide: $V = a^2 \cdot b/2$ donde a y b son el ancho y el largo del tumor respectivamente, ambos expresados en milímetros. El tamaño de los tumores fue expresado como volumen tumoral relativo. Este fue calculado por la fórmula V_i/V_o , donde V_i es el volumen tumoral medido a un determinado tiempo y V_o es el volumen tumoral medido al inicio de cada experimento (140).

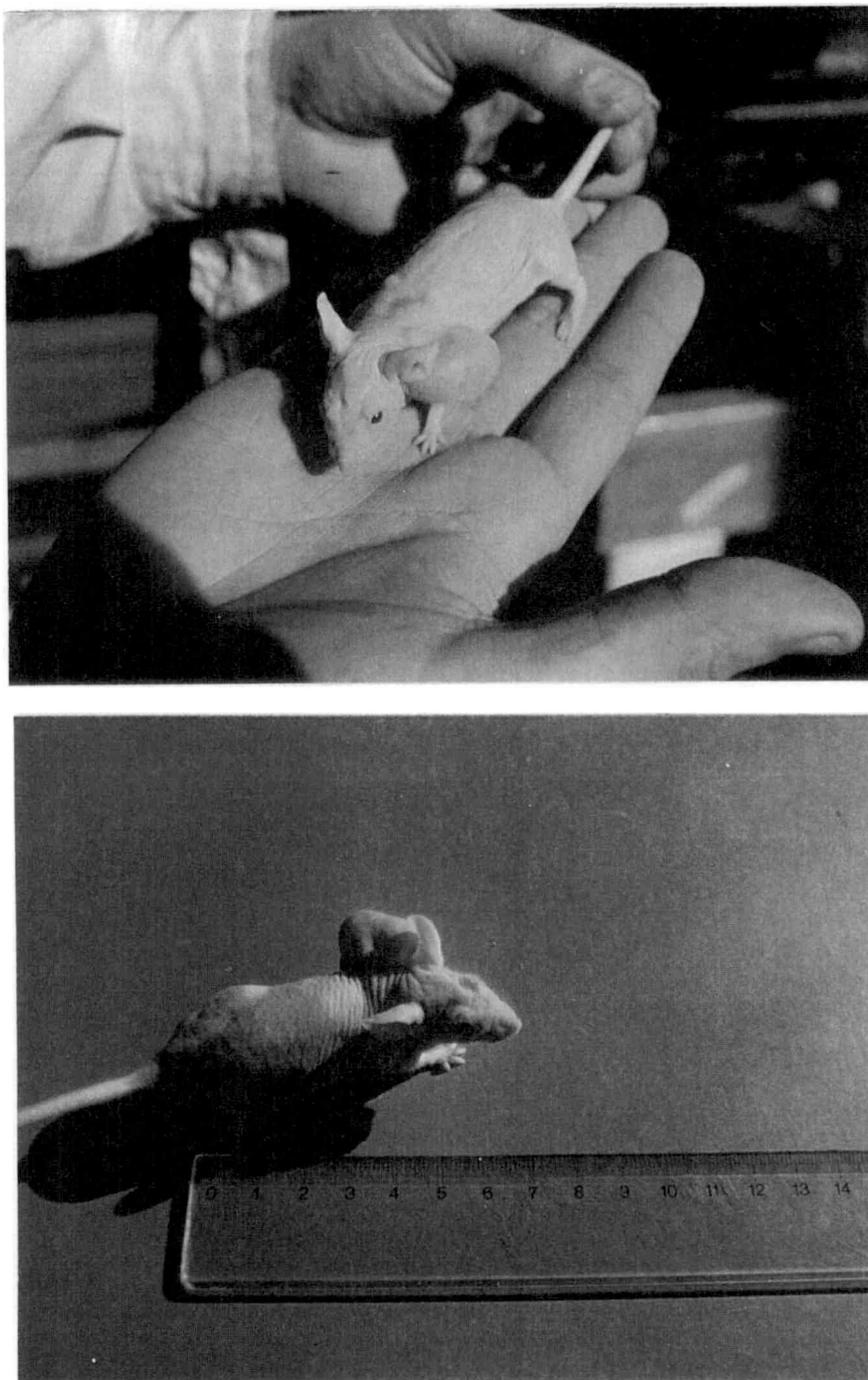


Figura II.3. Desarrollo del HLMC implantado en ratones NIH "nude". Las fotografías fueron tomadas 40 días después de inyectar subcutáneamente en el espacio interescapular 0,2 ml de una suspensión de células del HLMC.

II.B.1.d. Obtención de sal sódica de Simvastatin.

El Simvastatin es normalmente administrado bajo la forma de lactona insoluble en agua y en el intestino delgado con el pH alcalino se transforma en la forma aniónica activa y es absorbido. Dado que en estos experimentos la droga fue suministrada a los animales a través del agua de bebida fue necesario transformarla previamente en su forma aniónica para poder solubilizarla. Se utilizó la técnica descrita por Sebti y col. para obtener sal sódica de Lovastatin (141) levemente modificada. Se disolvió el Simvastatin en etanol absoluto a 60 °C y se adicionó una cantidad equimolar de NaOH. Después de 1 hora de calentamiento a 60 °C, se evaporó el etanol bajo corriente de N₂ y la sal sódica de Simvastatin así obtenida fue disuelta en agua esterilizada a una concentración final apropiada.

II.B.1.e. Obtención de microsomas lavados de hígado y tumor.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se removieron rápidamente los hígados y tumores. Trabajando sobre hielo se les eliminó los tejidos extraños y fueron lavados, pesados y homogeneizados siguiendo la proporción de 10 ml de solución homogeinizadora por gramo de tejido húmedo. El proceso de homogeneizado se realizó en forma mecánica empleando un homogeinizador Kontes vidrio-teflón de 15 ml de capacidad, accionado con un equipo Tri-R-Stir-R (modelo S-63C).

La composición de la solución homogeinizadora utilizada fue la siguiente: Tris/HCl (pH: 7,4) 50 mM; sacarosa 300 mM; NaCl 50 mM; EDTA 10 mM y DTT 10 mM (142).

La fracción microsomal se obtuvo por centrifugación diferencial. Luego de filtrar por gasa al homogenato crudo, se lo centrifugó a 12.000 xg durante 20 min. en una centrífuga Sorvall modelo RC5C (rotor SS-34), a 4°C. El pellet consistente en restos celulares, núcleos y mitocondrias, se descartó y el sobrenadante se

ultracentrifugó a 105.000 xg durante 60 min. en una ultracentrífuga refrigerada Spinco modelo L 2-65, clase F, rotor 50 Ti, mantenida a 1-4°C. Se desechó el sobrenadante y se obtuvo el pellet de microsomas.

El pellet microsomal se resuspendió en una solución de lavado, conteniendo un detergente no iónico, incubando luego 10 min. a 37°C. El objeto de este lavado fue eliminar la contaminación con Simvastatin que pudiesen presentar los microsomas de animales que fueron previamente tratados con esta droga (143).

La solución de lavado utilizada fue: buffer fosfato (pH: 7,4) 100 mM; EDTA 10 mM; DTT 2 mM y Brij 96 5%.

Finalmente se centrifugó nuevamente 60 min. a 105.000 xg en Spinco refrigerada y se descartó el sobrenadante.

El pellet microsomal lavado así obtenido se almacenó a -80°C conservando casi el 100 % de la actividad HMG-CoA reductasa durante 15 días.

En el momento de ser utilizado, el pellet se resuspendió en buffer Imidazol/HCl (pH: 7,4) 20 mM y DTT 5 mM de forma tal de obtener unos 4 mg de proteína microsomal por mililitro.

II.B.1.f. Determinación de proteína microsomal.

La cantidad de proteínas en suspensiones microsomales se determinó por medio de la microtécnica de Lowry (144) previa dilución de las muestras con solución fisiológica para lograr que el contenido proteico de la alícuota tomada se encuentre dentro de la zona de linealidad de esta técnica (0 a 300 µg por tubo de reacción).

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

II.B.2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA UTILIZADA PARA CULTIVO DE CÉLULAS.

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

Se trabajó con la línea tumoral Hep G2 proveniente de un hepatoma humano. Originalmente, se obtuvo a partir de una biopsia tumoral de hígado durante una lobectomía practicada, en 1975, a un niño caucásico de 15 años de edad originario de Argentina. Los trozos de tumor se cultivaron sobre lechos de células de ratón irradiado (145) en medio de William's E con 10 % de suero fetal, iniciándose de esta manera la línea. El análisis histopatológico de este tumor en las biopsias fue compatible con carcinoma bien diferenciado con patrón trabecular. Por otro lado se comprobó la capacidad de sintetizar y secretar alrededor de 15 de las principales proteínas plasmáticas, entre ellas albúmina humana y α -fetoproteína. Se trataría de una línea tumoral hepática primaria o hepatoblastoma (146). El análisis cromosómico es anormal: la cantidad de cromosomas por célula varía entre 50 y 55 y contiene una alteración distintiva en su cromosoma 1 (147). La inyección de células de la línea Hep G2 a ratones atímicos no dio tumores como resultado (147).

La ultraestructura de estas células en cultivo muestra un patrón de organización normal de los organoides con numerosas gotas lipídicas no rodeadas por membrana. Existe cierta polarización de la célula con formación de canalículos similares a los biliares que contienen gran cantidad de microvellosidades (148). Estas células no se organizan en trabéculas como lo hacen los cultivos primarios de hepatocitos de rata (149), sino que se acumulan en placas de células que no presentan inhibición por contacto.

Esta línea tumoral la obtuvimos del American Type Culture Collection por una gentileza del Dr. Roberto de Antueno (Efamol Research, Canada). Los cultivos de esta línea tumoral se realizaron predominantemente en botellas cerradas de vidrio blando de 95 cm² de superficie de pegado (tipo Khole).

El medio de cultivo utilizado fue el Esencial Mínimo de Eagle (MEM) con sales de Earle y piruvato de potasio, y suero fetal bovino inactivado al 10 % (146). El medio de cultivo, cuya composición se muestra en la Tabla II.2., fue preparado en el laboratorio. La esterilización del mismo se realizó haciendo pasar el medio a través de filtros Sartorius de 0,22 μm de diámetro de poro, esterilizados previamente con calor húmedo. El suero fetal bovino estéril se obtuvo de la empresa Gen S.A. El mismo se inactivó calentándolo a 56°C en baño termostático durante 1 hora. Una vez inactivado, se agregó al medio estéril y el medio completo se fraccionó en botellas de vidrio que se guardaron en heladera (4°C).

Los subcultivos se realizaron despegando las células de la pared de la botella con una solución de tripsina estéril al 0,25 %. Luego, las células despegadas se resuspendieron en medio MEM, y una alícuota (cociente de dilución 7:1) se transfirió a botellas de cultivo estériles. La actividad enzimática de la tripsina se inhibió por el agregado de medio de cultivo, y se llevaron a un incubador para cultivo celular marca Bergman, de Alemania. Las células se incubaron a 37°C. Los subcultivos se realizaron cada siete días.

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

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

Tabla II.2.**Composición del Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle con sales Earle y aminoácidos no esenciales**

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

El pH del medio a 25°C es $7,5 \pm 0,3$ y la osmolaridad expresada en mOsm/Kg H₂O es $297 \pm 5\%$.

En los experimentos en los que fue necesario el uso de medio sin suero, se utilizó medio IMEM Zo, inicialmente concebido por Richter para el crecimiento de células HTC en medios carentes de suero (150). En nuestro caso hemos omitido el agregado de ácido linoleico e incorporamos HEPES a concentración 10 mM. En algunos experimentos se omitió también el rojo de fenol. La composición final aparece en la Tabla II.3. donde es posible observar que es un medio químicamente definido, libre de fuentes lipídicas y con considerable capacidad buffer.

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

Los procedimientos seguidos para la preparación de células Hep G2 permitieron la obtención de poblaciones homogéneas con elevada viabilidad y reproductibilidad de comportamiento metabólico.

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

La estimación de la viabilidad celular se efectuó por medio del test de exclusión de azul tripán (solución isotónica al 0,2%) (151). Este test rutinariamente indicó que el 90% o más de las células se encontraban en condiciones adecuadas de viabilidad.

Se ha establecido fehacientemente que el test de exclusión de azul tripán se correlaciona muy bien con otras pruebas de viabilidad celular tales como la fuga de lácticodeshidrogenasa, consumo de glucosa, captación de aminoácidos marcados a material tricloroacético-insoluble o microscopía electrónica (152 - 154).

Tabla II.3.

Composición del Medio IMEM Zo (modificado)

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

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

II.B.2.c. Homogeneización de suspensiones de células cultivadas en monocapa.

Para obtener una suspensión de las células que fueron cultivadas en monocapa se eliminó el medio de cultivo y las células, todavía adheridas a las botellas de cultivo, fueron lavadas tres veces con 10 ml de solución fisiológica helada. Posteriormente las células fueron removidas con una espátula de goma adicionando para ello un volumen conocido de solución fisiológica. La suspensión celular se recogió en tubos, se centrifugó a baja velocidad (1.500 xg, 5 min.), se descartó el sobrenadante y el pellet celular se congeló en nitrógeno líquido.

Inmediatamente antes de ser utilizado, el pellet de células se resuspendió adicionando 0,4 ml de buffer de resuspensión por miligramo de proteína celular.

La composición del buffer de resuspensión usado fue: buffer fosfato (pH: 7,4) 50 mM; EDTA 1 mM y DTT 5 mM (155, 156).

Utilizando un equipo Heat-Systems Ultrasonic, modelo W-220F (Plainview, New York) equipado con un microtip de la misma marca modelo C2, se sonicó a la suspensión celular 3 veces, durante 10 segundos cada vez, a la mitad de la potencia de salida. Esta operación se llevó a cabo manteniendo el material permanentemente en lecho de hielo.

II. B.2.d. Determinación de proteína celular total.

El dosaje de la proteína celular total (PCT) en suspensiones de células Hep G2 se llevó a cabo utilizando una técnica semejante a la descrita por Patterson (157) para lo cual una porción de la suspensión celular se centrifugó a baja velocidad (1.500 xg, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El pellet celular se resuspendió en un pequeño volumen de solución fisiológica (usualmente 200 μ l) y se sometió a digestión con reactivo "C" de Lowry. La disgregación celular se completó a 37°C en 60 min. o a temperatura ambiente en 10-12 horas. El proceso pudo ser fácilmente controlado por observación al microscopio óptico. De este

digerido alcalino translúcido, se tomaron alícuotas apropiadas y se aplicó la microtécnica de Lowry.

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

II.B.2.e. Aislamiento de ácidos nucleicos celulares.

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos se recurrió a la técnica de precipitación de ácidos nucleicos con ácido tricloracético frío (158).

Todas las muestras y el ácido tricloracético (TCA) se mantuvieron en lecho de hielo durante el procesamiento.

Las células se suspendieron en solución fisiológica en tubos de vidrio (4 ml) y se sonicaron de la manera descrita en el ítem II.B.2.c.

A la suspensión de células sonicadas se les agregó 1 ml de solución de TCA al 50 % para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 %. Esta mezcla se dejó en lecho de hielo durante 15 minutos y luego se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio marca Wathman GF/A conectado a un kitasato con presión negativa suave.

Los tubos de ensayo se lavaron tres veces con la solución de TCA al 10 % (5 ml) para evitar pérdidas de material y se pasaron también a través del filtro de fibra de vidrio donde quedan retenidos los ácidos nucleicos.

II.B.2.f. Incorporación de sustratos exógenos radiactivos.

II.B.2.f.1. Incorporación de acetato [$1\text{-}^{14}\text{C}$] en lípidos insaponificables y ácidos grasos de células y medio condicionado: El material radiactivo ($3\ \mu\text{Ci}/\text{botella}$) se agregó al medio de incubación, disuelto en $50\ \mu\text{l}$ de IMEM-Zo. Se incubó por un período de 24 horas, se separaron las células del medio. Se extrajeron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos totales en la forma que se describe en el ítem II.B.3.b. y se determinó la radiactividad total incorporada en estos lípidos tomando alícuotas (usualmente de 5 y $10\ \mu\text{l}$) que se contaron por triplicado. Los distintos componentes del insaponificable fueron separados por TLC como se describe en el ítem II.B.3.c., la región correspondiente al colesterol fue raspada de la placa determinándose la radiactividad total incorporada en colesterol.

II.B.2.f.2. Incorporación de colesterol [$1,2\text{-}^3\text{H(N)}$] en células Hep G2: el material radiactivo ($10\ \mu\text{Ci}/\text{botella}$) se adicionó previamente solubilizado en etanol ($1\ \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$). Se incubó durante 24 horas en presencia de la sonda radiactiva. Para determinar la radiactividad incorporada las células fueron lavadas y cosechadas. Los lípidos insaponificables fueron extraídos con éter de petróleo como se describe en el ítem II.B.3.b. y se determinó la radiactividad presente en los mismos.

II.B.2.f.3. Incorporación de Timidina [$\text{metil-}^3\text{H}$] en ADN de células Hep G2:

La timidina marcada radiactivamente ($10\ \mu\text{Ci}/\text{botella}$) fue adicionada directamente al medio de incubación dado que se solubiliza con facilidad en el mismo. Se incubó durante 72 horas en presencia de la sonda radiactiva y para la cuantificación de la marca incorporada en el ácido desoxirribonucleico se recurrió a la precipitación de ácidos nucleicos con ácido tricloracético frío descrita en el

ítem II.B.2.e. El filtro conteniendo el ADN precipitado se retiró con cuidado, se dejó secar al aire y se determinó la radiactividad.

En todos los casos los conteos de radiactividad se efectuaron en viales de vidrio conteniendo 10 ml de líquido de centelleo que cada 1000 ml de tolueno contiene 100 mg de POPOP y 4 gr de PPO (159). Cada vial se contó durante 10 a 20 min según fuera su actividad. Se utilizó un contador de centelleo líquido RackBeta 1214.

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

II.B.3. METODOLOGÍA GENERAL.

II.B.3.a. Ensayo de actividad HMG-CoA reductasa "in vitro".

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando una modificación de la técnica de Shapiro y col. (160) descrita por Brown y col. (161).

Este ensayo se realizó en dos tipos de materiales biológicos, tejidos y células en cultivo, utilizándose como fuente de enzima: pellet microsomal resuspendido o suspensión celular homogeneizada por sonicación, respectivamente.

Para medir la actividad reductasa total, se tomó una alícuota de suspensión microsomal (50 a 200 μ g de proteína) o de células homogeneizadas (100 μ g de proteína), se llevó a un volumen de 90 μ l con el mismo buffer de resuspensión usado en cada caso y se preincubó 30 min. a 37°C para permitir la activación de la enzima que pudiese estar inactivada por fosforilación. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de una solución de cofactores conteniendo: buffer fosfato (pH: 7,4) 0,2 M; glucosa-6-P 40 mM; NADP⁺ 5 mM; EDTA sódico 20 mM; DTT 10 mM y glucosa-6-P deshidrogenasa 0,7 UI. El ensayo se inició con la adición de

DL-[3-¹⁴C]-HMG-CoA (13.000 cpm/nmol y 3,52 nmol/μl) a una concentración final de 176 μM (para ensayos estándar). El volumen final de la mezcla de incubación fue de 200 μl.

Luego de incubar 30 min. a 37°C se detuvo la reacción agregando 25μl de HCl 6M. Se adicionó [³H]mevalonolactona (50 nCi) como estándar interno, se lactonizó el ácido mevalónico obtenido en la reacción incubando 30 min. a 37°C en el medio ácido y para acelerar la precipitación de las proteínas desnaturalizadas se centrifugó 5 min a 8.000 rpm.

La mevalonolactona se separó por cromatografía en capa fina (TLC) sembrando 100 μl del sobrenadante libre de proteínas en placas de vidrio de 20 x 20 cm. con una capa de silicagel G de 0,25 mm. de espesor, activadas durante 45 min. a 120°C. La cromatografía se desarrolló utilizando benceno:acetona (1:1, v/v) como fase móvil previa saturación de la cuba de desarrollo con vapores de esta mezcla de solventes.

Finalizada la cromatografía las placas se secaron al aire y la región correspondiente a mevalonolactona (aprox. R_F 0,5-0,9) fue removida de la placa por raspado de la sílica y se recogió en viales de vidrio conteniendo 10 ml de solución de centelleo dioxano-fluor que contiene 5 g de difeniloxazole (PPO) y 100 g de naftaleno por cada litro de tolueno. La radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido RackBeta 1214 utilizando un programa de detección dual para ³H ¹⁴C. El estándar interno de [³H]mevalonolactona es utilizado para corregir, por recuperación incompleta, el dato hallado en ¹⁴C.

Cabe destacar que el R_F correspondiente a mevalonolactona fue determinado raspando placas de prueba cada 1 cm., repitiéndose el procedimiento con cada lote comercial de placas usado.

La actividad de HMG-CoA reductasa fue expresada en pmoles de mevalonolactona / mg de proteína (microsomal o celular) / min.

II.B.3.b. Extracción de lípidos insaponificables y ácidos grasos totales.

En varias oportunidades fue necesario extraer los lípidos insaponificables totales de plasma, tejidos, microsomas, células Hep G2 y de medio de cultivo liofilizado para separarlos posteriormente por cromatografía en capa fina o bien cuantificar el contenido de colesterol por cromatografía gas-líquido. En algunos casos también fueron extraídos ácidos grasos totales de células y medio de cultivo.

La extracción de lípidos insaponificables y de ácidos grasos totales requiere la saponificación previa de las muestras que se logra tratándolas con álcali para hidrolizar los ácidos grasos de los ésteres de colesterol, acilglicéridos y fosfoglicéridos y convertirlos en jabones insolubles en solventes orgánicos poco polares, usados para la extracción de lípidos.

Para ello se tomaron alícuotas de cada uno de los distintos materiales biológicos, se les agregó una solución de KOH al 10% en etanol absoluto (libre de carbonatos) en una proporción de 8 ml por g de lípido, se gasearon con nitrógeno para evitar oxidaciones y en recipientes bien tapados se los calentó a 80°C durante 45 min. (162). Se agregó a la mezcla fría igual volumen de agua destilada y los lípidos insaponificables fueron extraídos por agitación de la fase acuosa con 2 ml de éter de petróleo (p.e.: 30-40 °C), repitiendo esta operación tres veces. Completada la extracción de lípidos insaponificables se liberaron los ácidos grasos de sus sales potásicas por acidificación con HCl pro-análisis y se los extrajo por agitación de la fase acuosa con 2 ml de éter de petróleo tres veces. En ambos casos los extractivos etéreos se reunieron en tubos cónicos de vidrio, con cuello y tapa esmerilados.

Los lípidos insaponificables y ácidos grasos extraídos fueron almacenados en éter de petróleo, bajo atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad y a -20°C, hasta el momento de su análisis, sin detectarse en estas condiciones la formación de productos de oxidación.

II.B.3.c. Separación de lípidos insaponificables por cromatografía en capa fina.

Para la separación del colesterol y sus precursores se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm y silicagel G como fase estacionaria con un espesor de 0,25 mm sin fluorescente (Merk, Alemania). La fase móvil fue cloroformo 100 %. La cuba de desarrollo conteniendo el solvente de corrida se saturó previamente con los vapores del mismo.

Una vez desarrolladas las placas, se secaron en atmósfera de nitrógeno y el revelado de las manchas se realizó exponiéndolas a vapores de yodo bisublimado. El yodo es un reactivo inespecífico que tinte las zonas lipídicas de color pardusco. Este procedimiento, si bien no permite una identificación exacta de los distintos lípidos, permite comparar los R_F con estándares que se siembran simultáneamente.

Los lípidos separados en las corridas cromatográficas para lípidos insaponificables fueron (valor de R_F entre paréntesis): colesterol (0,34), lanosterol (0,52) y escualeno (0,81).

II.B.3.d. Determinación del contenido de colesterol por GLC.

En todos los casos la determinación del contenido de colesterol en el extracto etéreo de lípidos insaponificables de los distintos materiales biológicos se realizó por cromatografía gas-líquido (GLC). Se utilizó un Cromatógrafo de gases Shimadzu GC R1A acoplado a un procesador computarizado (Shimadzu RPR-G1) que permitió ensayar numerosas condiciones operativas. Se usaron columnas de vidrio de 1.80 m de largo y 2 mm de diámetro interno con relleno SE-30 al 3% en Supelcoport 80/100 (fase estacionaria). El sistema de detección utilizado fue una celda de ionización de llama de hidrógeno. Se obtuvo una resolución óptima operando en condiciones isotérmicas con el horno a 250°C a lo largo de los 45 min. programados para el desarrollo de la corrida. Como gas portador se usó Nitrógeno

purísimo anhídrido a un flujo de 20 ml/min. Se trabajó con el detector a 300 °C y se mantuvo la cámara de inyección a 30 °C por encima de la temperatura del horno.

La terminal del equipo suministró listados de tiempos de retención absolutos y áreas de cada señal.

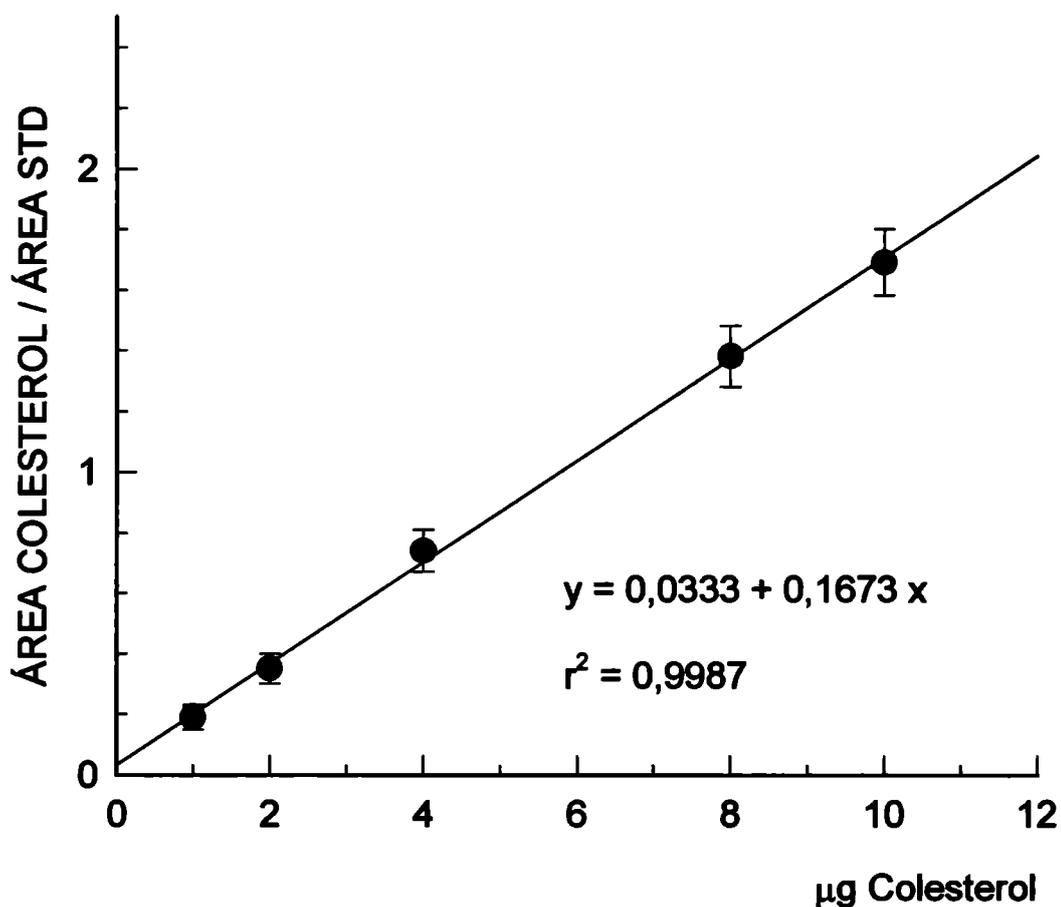
Para poder correlacionar el área detectada con la cantidad de colesterol presente en la muestra se construyó una curva de calibración utilizando un standard interno extraño a la muestra, agregando una cantidad constante del mismo a cantidades crecientes de standard de colesterol. Se prepararon mezclas que contenían entre 1 y 10 µg de colesterol y una cantidad fija de 10 µg de β-sitosterol, un esteroide de origen vegetal usado como standard interno. La curva se construyó haciendo el cociente de áreas entre colesterol y standard (A_{COL}/A_{ST}) en función de la cantidad de colesterol sembrada.

La curva obtenida (Figura II.4) se pudo ajustar mediante una ecuación lineal de la forma $y = a + bx$.

Para cada muestra, con un contenido X de colesterol, se agregó una cantidad N conocida de standard interno antes de realizar la saponificación y extracción de lípidos insaponificables. Se sembró una alícuota del insaponificable y a partir del cromatograma se calculó la razón de áreas (A_X / A_{ST}). Con este dato y utilizando la curva de calibración se obtuvo la masa de colesterol sembrada.

Figura II.4.

Curva de calibración para cuantificación de colesterol separado por GLC en condiciones isotérmicas.



Cada punto es la media de 5 determinaciones ± 1 desviación standard. Como standard interno se empleó β -sitosterol. La curva se ajustó mediante regresión lineal a una ecuación de la forma $y = a + bx$ donde: $a = 0,033$; $b = 0,1673$ y $r^2 = 0,9987$.

II.B.3.e. Tratamiento estadístico de los resultados.

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

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

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

CAPÍTULO III

ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL
COLESTEROL EN EL MODELO TUMOR DE PULMON HUMANO/
RATONES ATIMICOS
EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE SIMVASTATIN.

ACTIVIDAD DE HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL EN EL MODELO TUMOR DE PULMÓN HUMANO/RATONES ATÍMICOS. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SIMVASTATIN.

La HMG-CoA reductasa hepática presenta, en todas las especies estudiadas, una variación circadiana de su actividad con un pico máximo en la mitad de la fase oscura en roedores (163 168). En nuestro bioterio el ciclo de oscuridad se extiende desde las 6 p.m. hasta las 6 a.m. y por lo tanto, la mitad de la fase oscura corresponde a las 12 p.m.. De modo que, atendiendo a la posible variación cíclica de la actividad de esta enzima en los ratones “nude”, en todos los experimentos pertenecientes a este capítulo un grupo de animales, tanto portadores de tumor como no portadores, fue sacrificado a la medianoche y otro al mediodía.

III.A. CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA HEPÁTICA Y TUMORAL.

En estos experimentos se realizó la caracterización cinética de la HMG-CoA reductasa en hígado de ratones “nude” y en el HLMC desarrollado en estos animales. Dado que esta caracterización no se había realizado en ningún tumor de pulmón ni en hígado nude, esta etapa imprescindible fue previa a la determinación de actividad enzimática específica, permitiendo fijar condiciones de ensayo que aseguren que la actividad registrada depende exclusivamente de la cantidad de enzima presente en el medio de incubación. Las condiciones fijadas sirvieron también como base para el posterior análisis del efecto de la administración de simvastatin sobre la actividad de la enzima.

En todos los experimentos de caracterización se utilizó como fuente de enzima microsomas lavados obtenidos a partir de pools de homogenatos de cada uno de los tejidos analizados.

III.A.1. SÍNTESIS DE MEVALONATO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO.

La velocidad de síntesis de mevalonato determinada utilizando distintas concentraciones de sustrato en el medio de incubación se muestran en la Tabla III.1. Cuando la concentración de sustrato ensayada fue 1/2x; 1x; 2x y 3x de la standard (176 μM) se observaron pequeñas variaciones en la velocidad de síntesis de mevalonato que son directamente proporcionales a la cantidad de HMG-CoA presente sin que exista una relación lineal entre ellas.

TABLA III.1.

ACTIVIDAD HMG-COA REDUCTASA DETERMINADA USANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO EN EL MEDIO DE INCUBACIÓN.

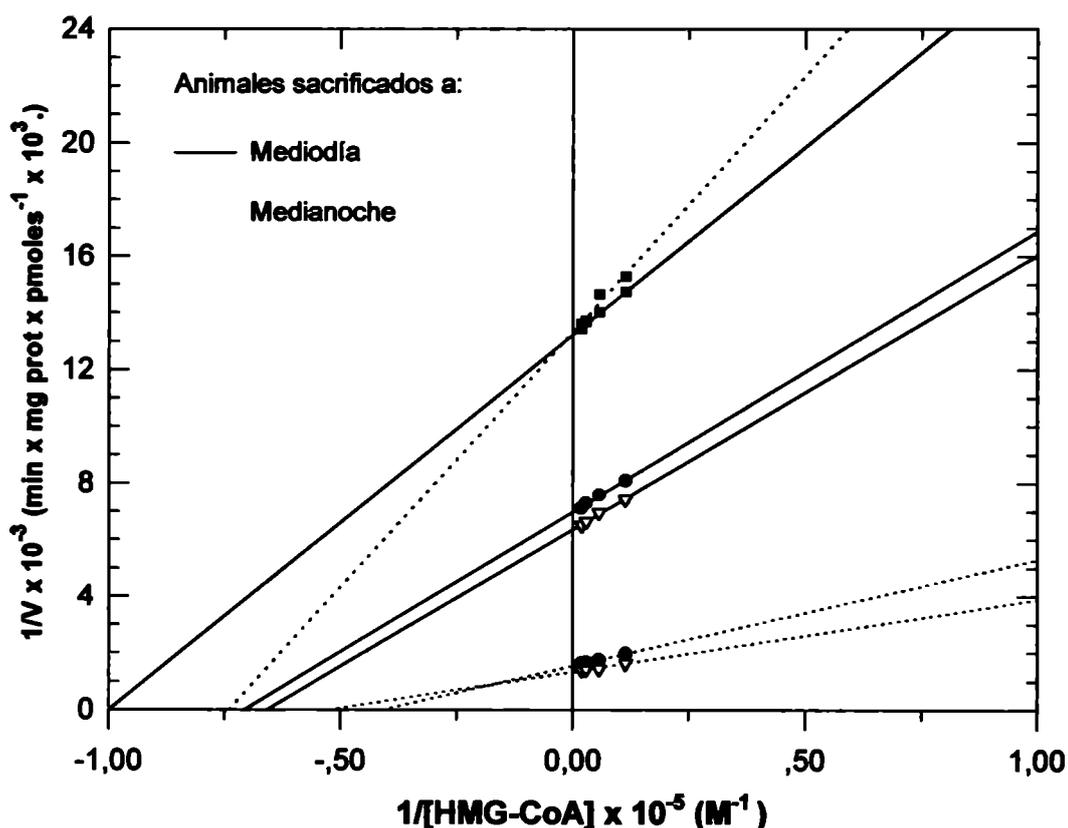
La actividad enzimática fue determinada en tumor (T) e hígado (H) de animales portadores (p) y no portadores (np) sacrificados a las 12 a.m. (D) y a las 12 p.m. (N). Los análisis fueron realizados por el método standard descrito excepto por los cambios indicados en la concentración de DL-hidroximetilglutaril CoA. Los valores representan promedios de análisis realizados por triplicado utilizando alícuotas de los respectivos pools de microsomas con cantidades fijas de proteína microsomal: (*) 100 μg y (**) 40 μg .

[HMG-CoA] μM	Actividad específica (pmoles/min./ mg de proteína microsomal)					
	HnpD (*)	HnpN (**)	HpD (*)	HpN (**)	TD (*)	TN (*)
88	123,51	506,28	134,39	610,13	67,91	65,48
176	131,83	578,51	143,51	698,83	71,34	68,31
352	137,11	609,74	150,54	706,01	73,14	72,84
528	140,18	614,11	153,59	715,21	74,52	73,53

Utilizando estos datos y trazando la doble recíproca de Lineweaver-Burk fue posible calcular la constante de Michaelis-Menten aparente (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). Los resultados se muestran en la Figura III.1 y en la Tabla III.2.

FIGURA III.1.

CURVAS DE LINEWEAVER-BURK PARA HMG-CoA REDUCTASA.



Incubaciones realizadas por triplicado con las concentraciones de HMG-CoA y las cantidades de proteína microsomal indicadas en la Tabla III.1:

(▽) Hígado no portador; (●) Hígado portador; (■) Tumor.

Las desviaciones standard, que en todos los casos fueron menores al 10%, fueron omitidas por simplicidad.

TABLA III.2.

**VELOCIDAD MÁXIMA Y CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN
CALCULADAS PARA LA ENZIMA HEPÁTICA Y TUMORAL.**

Las constantes cinéticas fueron calculadas a partir de las curvas de Lineweaver-Burk ajustando los datos por análisis de regresión a rectas del tipo $y = b + ax$. En todos los casos el coeficiente de correlación lineal (r^2) fue mayor a 0,96

Fuente de microsomas	Km_a (M)	V_{max} (pmoles/min./mg prot. micros)
HnpD	$1,43 \times 10^{-5}$	142,86
HnpN	$2,42 \times 10^{-5}$	625,00
HpD	$1,51 \times 10^{-5}$	156,25
HpN	$1,89 \times 10^{-5}$	769,23
TD	$1,01 \times 10^{-5}$	75,76
TN	$1,39 \times 10^{-5}$	75,19

Los valores de Km hallados para los diferentes tejidos y a distintas horas de sacrificio son todos del mismo orden de magnitud.

La V_{max} calculada para la enzima hepática es notablemente mayor en animales sacrificados a la medianoche. Mientras que, para la enzima tumoral el valor de V_{max} hallado es similar independiente de la hora de sacrificio y es aproximadamente la mitad del detectado en hígado de ratones nude sacrificados al mediodía.

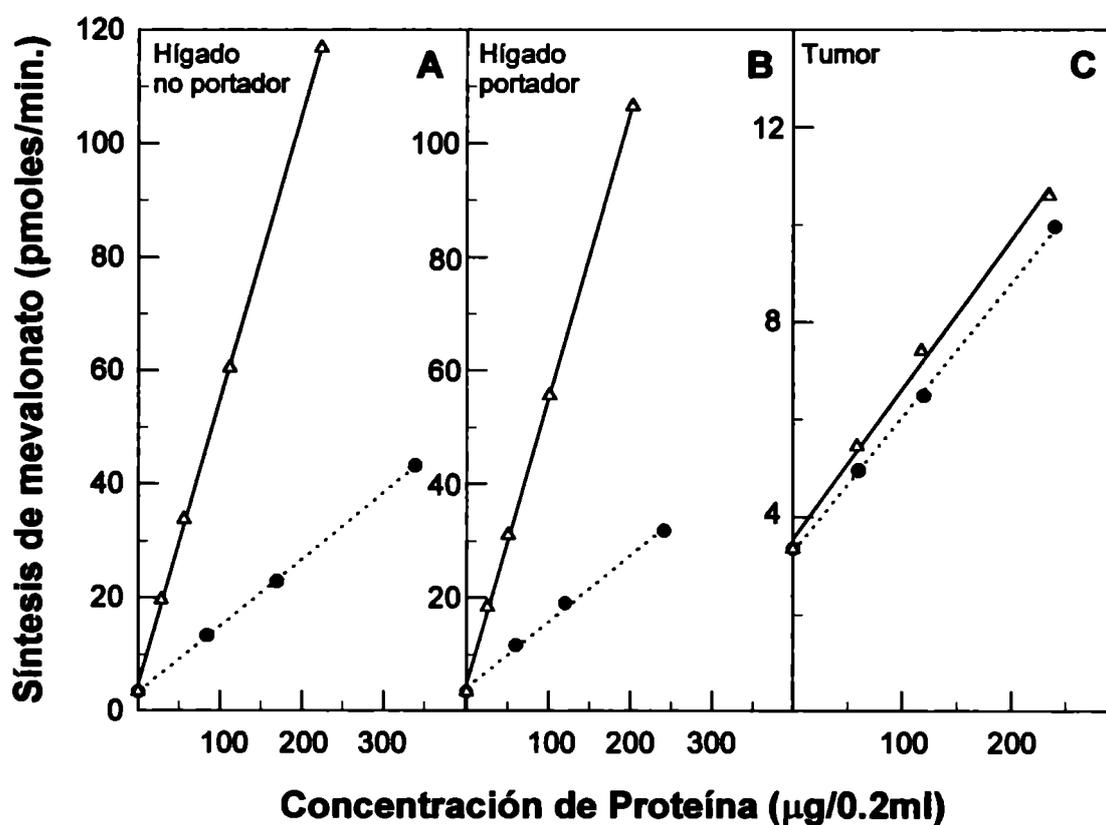
III.A.2. SÍNTESIS DE MEVALONATO EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA MICROSOMAL.

Cuando se incubaron cantidades crecientes de proteína microsomal con una cantidad fija de HMG-CoA (35,2 nmoles) durante 30 min. pudo observarse que la velocidad de síntesis de mevalonato es directamente proporcional a la cantidad de

proteína microsomal ensayada (Figura III.2) aún en aquellos tejidos que presentan una elevada actividad de HMG-CoA reductasa microsomal como el hígado de animales sacrificados a la medianoche. En todos los casos los datos pudieron ajustarse por análisis de regresión a rectas del tipo: $y = b + ax$, donde b corresponde al blanco de reactivos ensayado y es de 3,34 pmoles de mevalonato/min.

FIGURA III.2.

VELOCIDAD DE SÍNTESIS DE MEVALONATO UTILIZANDO DISTINTAS CANTIDADES DE PROTEÍNA MICROSOMAL



Animales portadores y no portadores del HLMC fueron sacrificados a la medianoche (.....) y al mediodía (—). Aliquotas de pools de microsomas de tumores e hígados fueron incubadas en presencia de HMG-CoA 176µM. Cada punto es el promedio de análisis realizados por triplicado.

III.B. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA Y CONTENIDO DE COLESTEROL. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL TUMOR SOBRE EL HÍGADO HUÉSPED.

En estos experimentos se determinó la actividad específica de la HMG-CoA reductasa hepática y tumoral y el contenido de colesterol del plasma, del HLMC y de hígado de animales portadores y no portadores del tumor. Se analizó como se modifican estos parámetros cuando los animales son sacrificados a las 12 a.m. y a las 12 p.m.. También se estudió la influencia que tiene la presencia del tumor sobre la actividad enzimática y el contenido de colesterol hepático de los animales huésped.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo sangre por punción cardíaca recogiendo en tubos conteniendo EDTA y el plasma fue separado por centrifugación. Hígados y tumores de los distintos lotes fueron removidos quirúrgicamente y procesado individualmente.

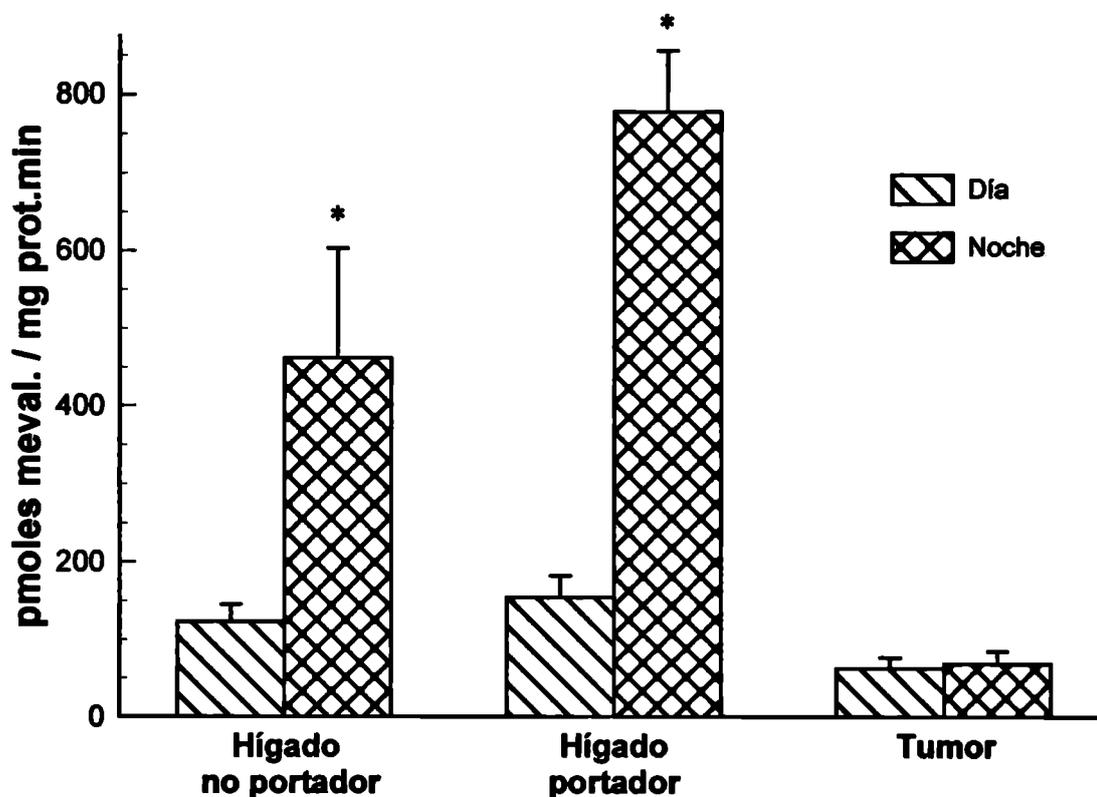
III.B.1. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA.

La actividad enzimática específica fue determinada en el tumor e hígado de animales portadores y no portadores, utilizando microsomas lavados como fuente de enzima, en las condiciones de ensayo standard descritas en el ítem II.B.3.a. de "Materiales y Métodos".

La actividad de la HMG-CoA reductasa hepática se halla incrementada muy significativamente en animales (no portadores y portadores del HLMC) sacrificados a la medianoche. En tumor no se registran diferencias en la actividad enzimática relacionadas con la hora del sacrificio del huésped y su valor corresponde aproximadamente a la mitad del hallado en hígado de animales sacrificados al mediodía (Figura III.3).

FIGURA III.3.

ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA HEPÁTICA TUMORAL



Animales portadores y no portadores del HLMC fueron sacrificados a las 12 a.m. (Día) y a las 12 p.m. (Noche) y los microsomas obtenidos de hígados y tumores fueron utilizados como fuente de enzima para la determinación de la actividad enzimática en condiciones de ensayo standard.

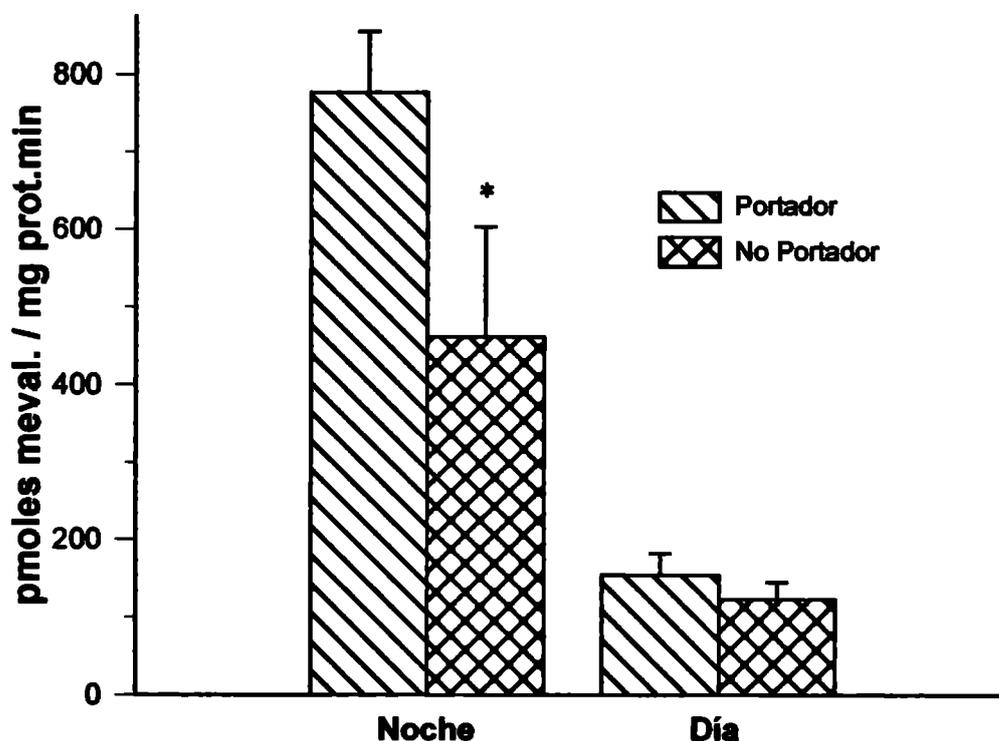
Los resultados se expresan en pmoles de mevalonato sintetizados por minuto y por miligramo de proteína microsomal y representan la media \pm 1 SD de diez determinaciones realizadas por duplicado.

(*) $p < 0,001$

La actividad de la reductasa hepática determinada a la medianoche en animales portadores de tumores es más elevada que en no portadores (Figura III.4). Se observa un incremento, tanto absoluto como relativo, del cambio de la actividad enzimática durante el ciclo diario en hígado de animales huéspedes del HLMC.

FIGURA III.4.

**EFFECTO DE LA PRESENCIA DEL TUMOR SOBRE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA HEPÁTICA DEL HUÉSPED**



Las referencias son las mismas que las de la Figura III.3.

(*) $p < 0,001$

III.B.2. CONTENIDO DE COLESTEROL.

El contenido de colesterol plasmático y hepático, tanto tisular como microsomal, fue determinado en animales portadores y no portadores del HLMC. También se cuantificó el colesterol tisular y microsomal de los tumores.

Utilizando alícuotas de los lípidos insaponificables extraídos de los distintos materiales biológicos, el colesterol fue separado por GLC en condiciones isotérmicas y se cuantificó utilizando β -sitosterol como standard interno según se describe en el ítem II.B.3.d de "Materiales y Métodos".

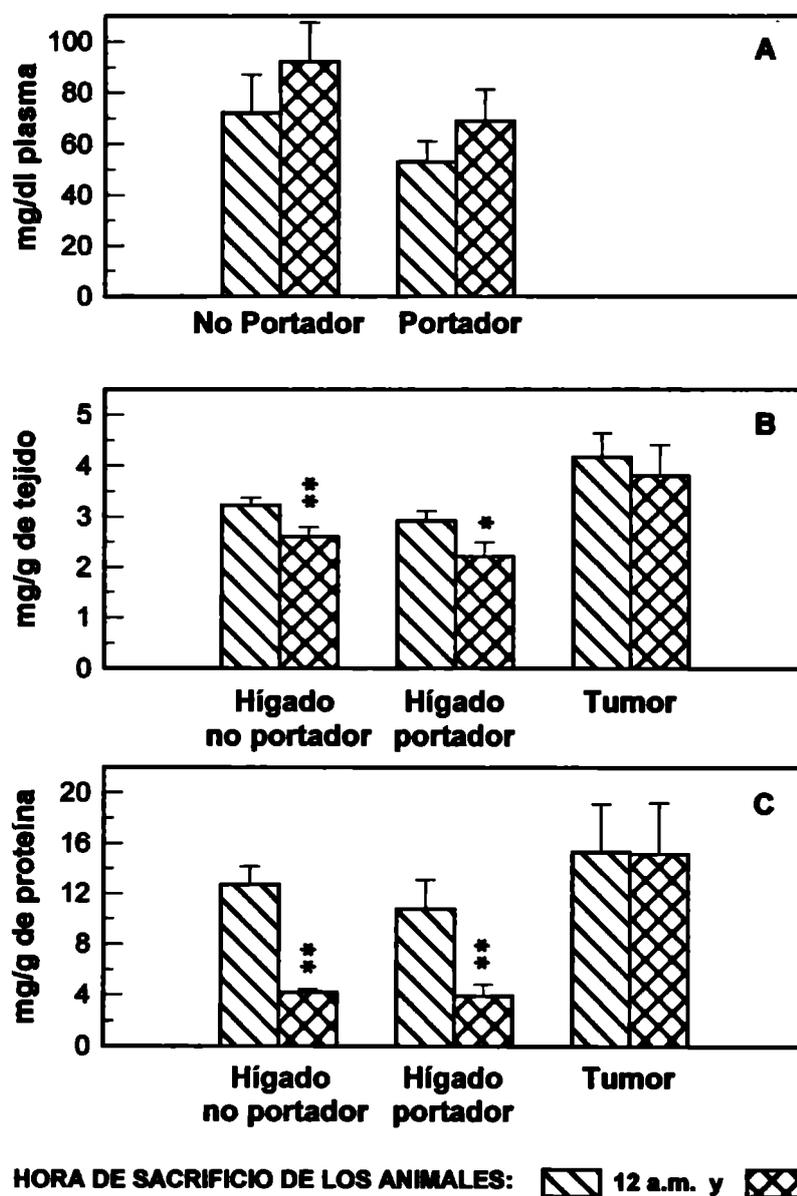
La Figura III.5 muestra como varía el contenido de colesterol registrado en la mitad de la fase oscura respecto del mediodía. Se observa una disminución del contenido de colesterol tisular y microsomal en hígado de animales portadores y no portadores del HLMC sacrificados a la medianoche. Mientras que en la colesterolemia se observa una tendencia, no significativa estadísticamente, a incrementarse durante la noche.

En el contenido de colesterol tumoral no se encontraron diferencias significativas cuando los animales portadores fueron sacrificados a las 12 p.m. (Figura III.5).

Las modificaciones en el contenido de colesterol de ratones nude ocasionadas por la presencia del tumor humano HLMC se muestran en la Figura III.6. En los animales portadores se observó una disminución de la colesterolemia y del contenido de colesterol tisular hepático, respecto de los no portadores. Esta modificación en el contenido de colesterol es significativa tanto al mediodía como a la medianoche.

FIGURA III.5.

MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE COLESTEROL EN FUNCIÓN DE LA HORA DE SACRIFICIO DEL ANIMAL

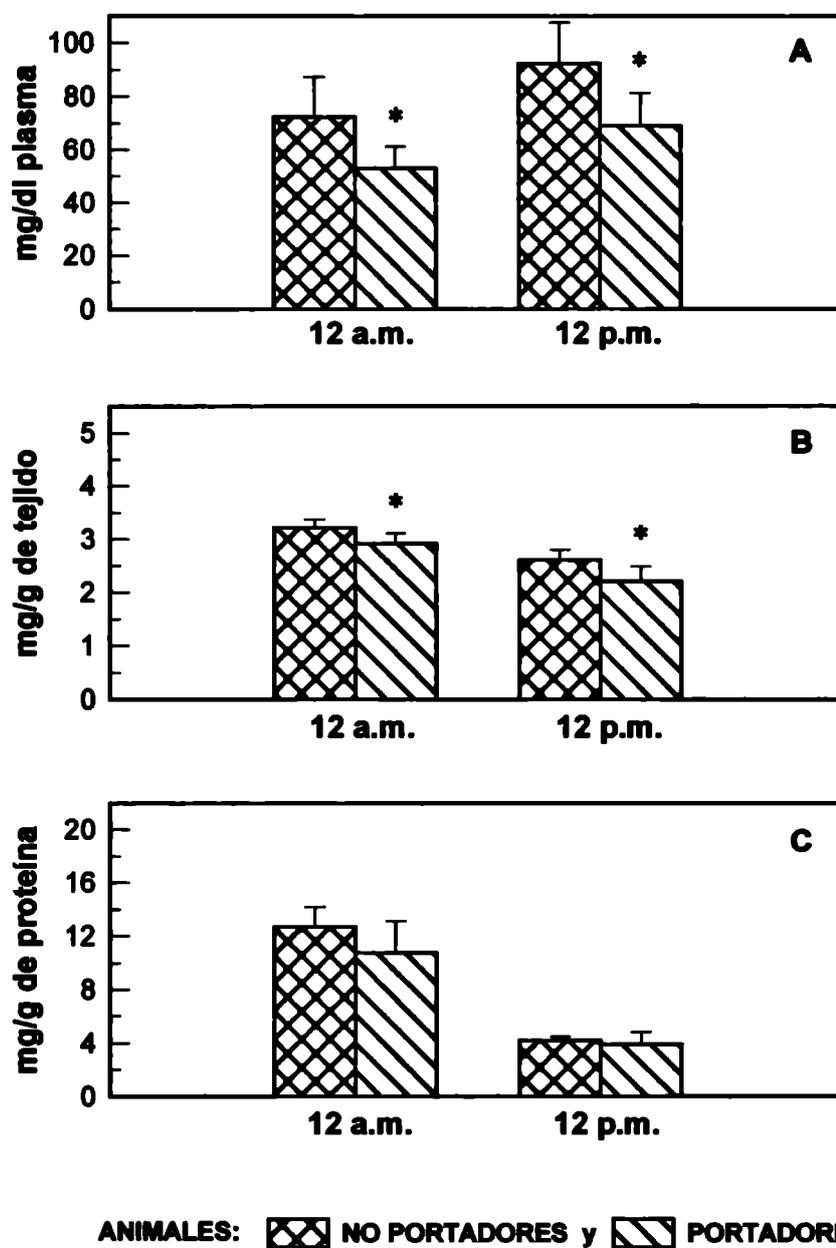


Animales portadores y no portadores fueron sacrificados al mediodía y a la medianoche. Se determinó la colesterolemia en plasma (A) y el contenido de colesterol tisular (B) y microsomal (C) en hígado y tumor. Los valores representan la media \pm 1 SD de cinco determinaciones.

(*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,001$

FIGURA III.6.

EFFECTO DE LA PRESENCIA DEL HLMC SOBRE EL CONTENIDO DE COLESTEROL DEL ANIMAL HUÉSPED



Contenido de colesterol plasmático (A) y hepático: tisular (B) y microsomal (C) determinado en animales portadores y no portadores del HLMC que fueron sacrificados al mediodía y a la media noche. Se muestran valores medios \pm 1 SD de cinco determinaciones. (*) $p < 0,05$

III.C. EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL HLMC DESARROLLADO EN RATONES NUDE, LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPÁTICO Y TUMORAL.

En estos experimentos se analizó el efecto de la administración de un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa, el Simvastatin, sobre el crecimiento, la actividad HMG-CoA reductasa y el contenido de colesterol tumoral. También se estudió el efecto que esta droga tiene sobre la colesterolemia, la actividad de la reductasa y el contenido de colesterol hepático de los ratones nude.

Para la realización de estos experimentos se dispuso de dos grupos de animales: no portadores (np) y portadores del tumor HLMC (p).

Cuando los tumores desarrollados en los ratones portadores alcanzaron un tamaño de 500-1000 mm³ los animales de ambos grupos, (np) y (p), fueron separados en lotes Control (C) y Simvastatin (S). Disponiéndose por lo tanto de cuatro lotes en total: Cnp; Snp; Cp y Sp. Todos los animales fueron alimentados "ad libitum" pero a los animales de los lotes Snp y Sp se les administró, a través del agua de bebida, una dosis de 50 mg/Kg peso/día de Simvastatin. Para poder solubilizar a la droga en agua fue necesario transformarla en su sal sódica tal como se describe en el ítem II.B.1.d.

Al cabo de 33 días de tratamiento, la mitad de los animales de cada lote fue sacrificado al mediodía (D) y el resto a la medianoche(N). Se les extrajo sangre por punción cardíaca y se removieron quirúrgicamente hígado y tumor.

III.C.1. CRECIMIENTO TUMORAL Y PESO CORPORAL.

Durante el tratamiento se pesó a los animales 2-3 veces por semana y los tumores fueron medidos con calibres. El volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula de un elipsoide y el tamaño tumoral se expresó como volumen tumoral relativo según se describe en el ítem II.B.1.c de "Materiales y Métodos". Debido a

que los tumores a medida que incrementan su tamaño se apartan de la forma elipsoidal, el volumen final de los mismos fue calculado a partir de su peso considerando una densidad del tejido tumoral de 1 g/cm^3 .

Puede observarse en la Tabla III.3 que al finalizar el tratamiento con Simvastatin no existe modificación en el tamaño de los tumores ni en el peso de los animales a los cuales se les administró la droga. No obstante, se observó una tendencia (estadísticamente no significativa) a una disminución de la tasa de crecimiento tumoral entre el séptimo y el décimo día de tratamiento que es precedida por una disminución en el peso corporal relativo de los animales (Figura III.7).

TABLA III.3.

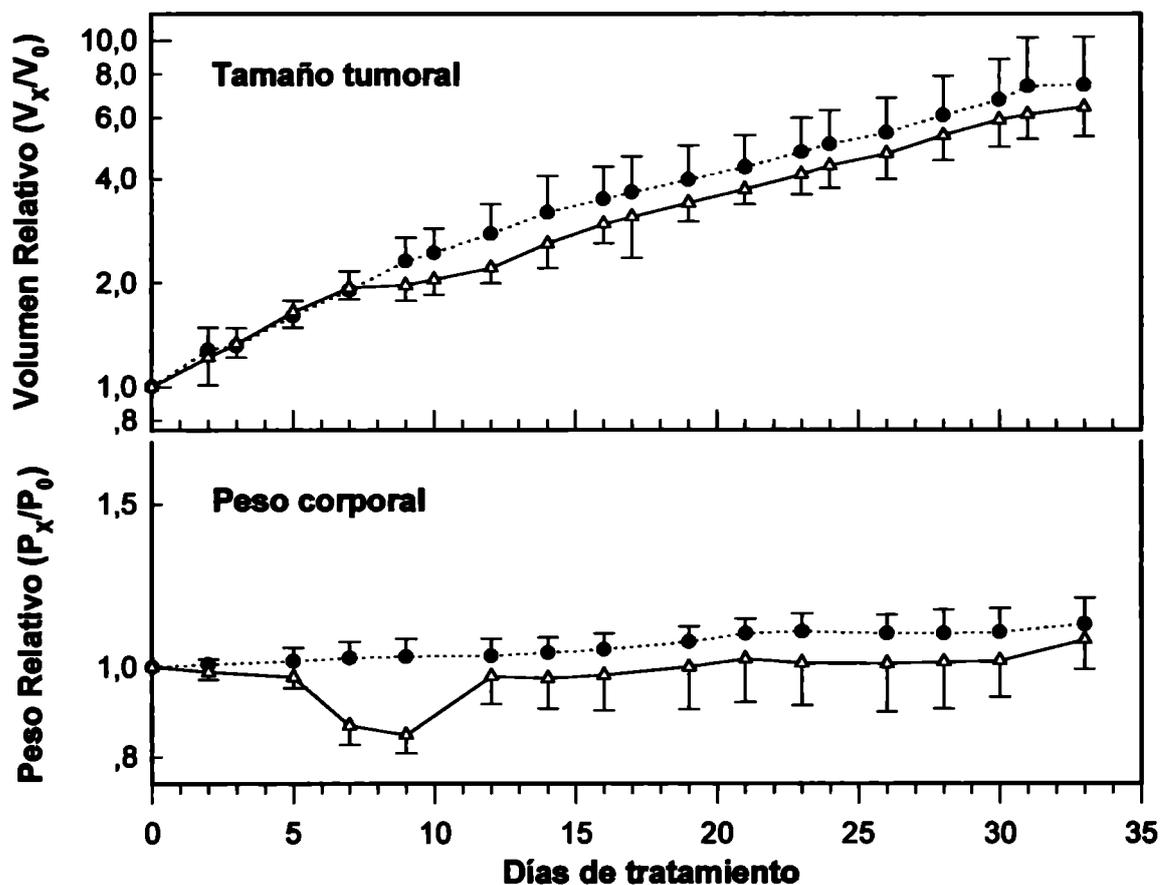
TAMAÑO DEL TUMOR DESARROLLADO EN RATONES NUDE Y PESO CORPORAL DE ANIMALES HUÉSPED TRATADOS CON SIMVASTATIN.

El tamaño de los tumores y el peso de los animales portadores registrados al finalizar al tratamiento se expresan como volumen tumoral y peso corporal relativo respectivamente. Los valores son la media \pm 1 SD de diez determinaciones.

Tratamiento	Peso Corporal (P_F/P_0)	Tamaño tumoral (V_F/V_0)
Control	$1,082 \pm 0,074$	$6,265 \pm 3,202$
Simvastatin	$1,070 \pm 0,012$ NS	$5,540 \pm 1,115$ NS

FIGURA III.7.

EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN DEL HLMC Y DEL PESO CORPORAL DE LOS RATONES NUDE A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CON SIMVASTATIN



Tamaño tumoral y peso corporal registrado en animales portadores del carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano (HLMC) pertenecientes a los lotes control (●) y Simvastatin (Δ). Los valores expresados como volumen y peso corporal relativo representan la media \pm 1 SD de 10 determinaciones.

III.C.2. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA TOTAL

En los tejidos de los animales tratados con Simvastatin la actividad de la reductasa se halla parcialmente bloqueada por la droga. De modo que para determinar la actividad enzimática total "in vitro" es imprescindible remover completamente al inhibidor que pueda permanecer contaminando a los microsomas aislados. Esto se logró lavando a los microsomas con un detergente no iónico según se describe "Materiales y Métodos".

Los resultados del ensayo de la actividad enzimática total en tumor e hígado de animales control y tratados con Simvastatin sacrificados a la medianoche y al mediodía son los presentados en la Tabla III.4. Se encontró una actividad HMG-CoA reductasa total significativamente mayor en microsomas de hígados y tumores pertenecientes a animales de los lotes tratados con Simvastatin.

El incremento de la actividad HMG-CoA reductasa microsomal ocasionado a nivel hepático por la administración de Simvastatin (expresado a través de la relación Simvastatin/Control) es significativamente mayor en los animales no portadores tanto a mediodía como a medianoche (Tabla III.4).

TABLA III.4.

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE SIMVASTATIN SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA HEPÁTICA Y TUMORAL.

La actividad enzimática total fue determinada en tumor e hígado de animales portadores y no portadores del HLMC. Los animales fueron sacrificados a las 12 a.m. y a las 12 p.m. Los valores son la media \pm 1 SD de cinco determinaciones realizadas por duplicado.

Tejido	Tratamiento	Actividad HMG-CoA reductasa (pmol/min/mg)	
		Mediodía	Medianoche
Tumor	Control	65,5 \pm 17,8	73,7 \pm 19,0
	Simvastatin	131,9 \pm 16,3 **	130,4 \pm 14,7 **
	S/C †	2,0	1,8
Hígado portador	Control	127,6 \pm 19,0	555,2 \pm 36,9
	Simvastatin	305,7 \pm 88,8 *	1207,4 \pm 125,9 ***
	S/C	2,4	2,2
Hígado no portador	Control	95,3 \pm 17,0	403,6 \pm 55,1
	Simvastatin	497,7 \pm 113,0 ***	1786,2 \pm 388,5 **
	S/C	5,2	4,4

*** $p < 0,0001$

** $p < 0,001$

* $p < 0,05$

† Relación de los valores de actividad reductasa hallados en el grupo tratado con Simvastatin (S) respecto al control (C).

III.C.3. CONTENIDO DE COLESTEROL.

El contenido de colesterol plasmático y hepático, tanto tisular como microsomal, fue determinado en los lotes de animales control y tratados con Simvastatin. También se cuantificó el colesterol tisular y microsomal de los tumores desarrollados en los animales de los lotes portadores del HLMC .

El colesterol fue separado del resto de los lípidos insaponificables por GLC en condiciones isotérmicas y se cuantificó utilizando β -sitosterol como standard interno según se describe en el ítem II.B.3.d de “Materiales y Métodos”.

No se encontraron diferencias en la colesterolemia registrada al mediodía y a la medianoche entre animales control y tratados con Simvastatin (Tabla III.5).

TABLA III.5.

COLESTEROLEMIA DE ANIMALES TRATADOS CON SIMVASTATIN.

Los valores se expresan en mg de colesterol/dl de plasma y son la media \pm 1 SD de cinco determinaciones.

Animales	Colesterol plasmático (mg/dl)			
	Mediodía		Medianoche	
	Control	Simvastatin	Control	Simvastatin
Portador	53,0 \pm 8,1	51,1 \pm 8,8	69,0 \pm 12,4	63,6 \pm 8,8
No Portador	72,3 \pm 14,9	57,3 \pm 8,7	92,2 \pm 15,3	72,1 \pm 17,1

En tumor e hígado de animales portadores tratados con Simvastatin sacrificados a las 12 a.m. y 12 p.m. el contenido de colesterol tisular y microsomal no se modificó (Tablas III.6 y III.7). Mientras que, en animales no portadores a los que se administró la droga se observa una disminución del colesterol a nivel tisular y microsomal, tanto a las 12 a.m. como a las 12 p.m.

TABLA III.6.

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE SIMVASTATIN SOBRE EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPÁTICO Y TUMORAL.

El contenido de colesterol fue determinado en tumor e hígado de animales portadores y no portadores del HLMC. Los animales fueron sacrificados a las 12 a.m. y a las 12 p.m. Los valores son la media \pm 1 SD de cinco determinaciones y se expresan en mg de colesterol/g de tejido húmedo.

Tejido	Tratamiento	Colesterol Tisular (mg/g tejido)	
		Mediodía	Medianoche
Tumor	Control	4,2 \pm 0,5	3,8 \pm 0,6
	Simvastatin	3,7 \pm 0,2	4,0 \pm 1,4
Hígado portador	Control	2,9 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3
	Simvastatin	2,8 \pm 0,2	2,5 \pm 0,4
Hígado no portador	Control	3,2 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2
	Simvastatin	2,7 \pm 0,1 **	1,9 \pm 0,4 *

** p < 0,01

* p < 0,05

TABLA III.7.

CONTENIDO DE COLESTEROL MICROSOMAL EN HÍGADO Y TUMOR DE ANIMALES TRATADOS CON SIMVASTATIN.

El contenido de colesterol fue determinado en microsomas lavados de tumor e hígado de animales portadores y no portadores sacrificados a las 12 a.m. y 12 p.m. Los valores son la media \pm 1 SD de cinco determinaciones y se expresan en mg de colesterol/g de proteína microsomal.

Tejido	Tratamiento	Colesterol Microsomal (mg/g prot.)	
		Mediodía	Medianoche
Tumor	Control	15,3 \pm 3,8	15,1 \pm 4,1
	Simvastatin	18,9 \pm 6,6	16,8 \pm 3,3
Hígado portador	Control	10,8 \pm 2,3	3,9 \pm 0,9
	Simvastatin	10,0 \pm 2,0	3,7 \pm 0,3
Hígado no portador	Control	12,7 \pm 1,5	4,2 \pm 0,3
	Simvastatin	8,7 \pm 1,4 *	2,1 \pm 0,4 **

** p < 0,001

* p < 0,01

III.D. DISCUSIÓN.

III.D.1. PROPIEDADES DE LA REDUCTASA HEPÁTICA Y TUMORAL.

La reductasa microsomal del tumor de pulmón humano desarrollado en ratones “nude” y del hígado de los animales huésped sacrificados al mediodía y a la medianoche tienen propiedades similares pese a pertenecer a tejidos distintos de especies diferentes. Los valores de K_m calculados para la enzima tumoral y hepática (tanto de portadores como de no portadores de tumor) indican que ésta presenta una afinidad por el sustrato similar en ambos tejidos y que es independiente de la hora de sacrificio del animal (Figura III.1 y Tabla III.2).

En todos los casos, cuando la concentración de sustrato excede en un orden de magnitud al valor del K_m , la velocidad de síntesis de mevalonato es proporcional a la cantidad de enzima aún en microsomas aislados de tejidos con elevada actividad reductasa como hígado de animales sacrificados a la medianoche en el rango de proteína microsomal ensayado (Figura III.2).

Los valores de K_m y V_{max} obtenidos para la enzima microsomal hepática de ratones “nude” son del mismo orden de magnitud que los encontrados por otros autores en hígado de rata (169, 170).

Desafortunadamente, no se dispone de datos de medida de la actividad de la reductasa en tejido pulmonar humano que permitan inferir si la V_{max} registrada en este tumor es alta o baja respecto al tejido normal. El único dato a partir del cual podría estimarse indirectamente la actividad de esta enzima en pulmón normal corresponde a la medida de incorporación de acetato ^{14}C en colesterol en slice de tejidos de rata donde se observa que la síntesis de colesterol a partir de acetato en pulmón es aproximadamente 5 veces menor que la registrada en el hígado de animales alimentados “ad libitum” sacrificados al mediodía (143). Dado que en el HLMC la actividad HMG-CoA reductasa encontrada corresponde a la mitad de la registrada en hígado de ratones nude alimentados “ad libitum” sacrificados al

mediodía y comparando con el único dato disponible, la actividad de esta enzima parece ser elevada respecto al tejido normal.

III.D.2. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y CONTENIDO DE COLESTEROL HEPÁTICO Y TUMORAL.

III.D.2.a. Variaciones mediodía/medianoche.

En todas las especies de roedores estudiadas, se han reportado notables variaciones cíclicas con periodicidad diaria en la actividad HMG-CoA reductasa hepática (163-168). En ratas, la actividad de la enzima se mantiene aproximadamente constante entre las 9 a.m. y las 5 p.m. A partir de las 6 p.m. se registra un rápido aumento de la actividad que alcanza su valor máximo a las 12 p.m. para luego decrecer en forma exponencial (169). Los ratones “nude” no parecen ser una excepción al resto de los roedores y presentan un incremento de 4-5 veces en la actividad de la enzima hepática a la medianoche (Figura III.3).

Los cambios cíclicos en la actividad enzimática durante el día pueden ser totalmente evitados por la administración de cicloheximida (169) y han sido interpretados como debidos a cambios en la velocidad de síntesis de la enzima (171). Usando métodos inmunoquímicos para medir la cantidad de proteína HMG-CoA reductasa y su velocidad de síntesis, Higgins y col. también concluyen que los cambios en la actividad durante el ciclo diario son debidos a alteración en la velocidad de síntesis de esta proteína con actividad enzimática (172, 173). El incremento de la actividad reductasa registrada en ratones “nude” a la medianoche puede interpretarse como un incremento de la cantidad de enzima presente dado que el valor del Km no se modifica (Figura III.1 y Tabla III.2).

El mayor contenido de colesterol hepático registrado en ratones nude al mediodía (Figura III.5) parece estar relacionado con los hábitos de alimentación nocturnos de estos animales. Se sabe que la fase oscura representa el tiempo de máxima ingesta de alimentos en ratas y ratones alimentados ad libitum (174) y que

la ingesta de una dieta rica en colesterol se traduce en un incremento del colesterol hepático después de 6 horas, estabilizándose 6 horas más tarde (169). Por lo tanto y dado que la fase oscura de nuestro bioterio se extiende desde las 6 p.m. hasta las 6 a.m., es probable que a las 12 p.m. comience a aumentar el colesterol hepático (como resultado de un incremento de la llegada del colesterol dietario absorbido a nivel intestinal 6 horas antes) llegando a estabilizarse aproximadamente a las 6 a.m.

Según se describió en el Capítulo I, el colesterol presente en los tejidos inhibe la síntesis operando a través de una represión de la velocidad de transcripción (41) y a nivel microsomal la presencia de colesterol acelera la degradación de la enzima (43, 45) a través de una interacción con el dominio transmembrana de la misma (44, 175). De modo que, la disminución del contenido de colesterol tisular y microsomal que acompaña al incremento de la actividad HMG-CoA reductasa hepática de ratones nude a la medianoche (Figuras III.5 y III.3), sugiere la posibilidad de que el aumento de los niveles enzimáticos se deba a un incremento de la velocidad de síntesis de la enzima y una disminución de la degradación ocasionada en parte por el bajo contenido de colesterol. No obstante, la exclusiva responsabilidad del patrón cambiante de llegada de colesterol dietario al hígado a lo largo del día en el cambio de la actividad reductasa queda descartada por evidencias de que los cambios cíclicos de la actividad enzimática ocurren aún cuando los animales son alimentados con dietas libres de colesterol y en condiciones en las cuales el colesterol sérico y hepático permanecen constantes (176).

En el tumor de pulmón humano desarrollado en ratones "nude" la actividad HMG-CoA reductasa y el contenido de colesterol mantienen un valor aproximadamente constante independientemente de la hora de sacrificio del animal (Figuras III.3 y III.5). De modo que, este tumor no presentaría cambios cíclicos en los niveles de actividad HMG-CoA reductasa y exhibiría una velocidad de síntesis

y contenido de colesterol aparentemente no modificados por la ingesta de alimentos, siendo éstas características comunes con la mayoría de los tejidos extrahepáticos (8 - 10).

III.D.2.b. Efecto de la presencia del tumor sobre el huésped.

Los ratones nude portadores del HLMC presentan alteraciones en la biosíntesis y homeostasis del colesterol.

Se observa una hipocolesterolemia, no relacionada al estado nutricional, en animales portadores del tumor (Figura III.6). Este resultado, que fue reportado previamente para este mismo modelo (139), coincide con lo observado en pacientes con diferentes enfermedades malignas incluyendo carcinoma de pulmón (177 - 181).

Es posible que los bajos niveles de colesterol plasmático sean una consecuencia de la elevada captación de LDL por las células tumorales dado que, en varios estudios llevados a cabo "in vivo" e "in vitro", se ha demostrado la existencia de una elevada actividad del receptor para LDL en células neoplásicas (182 - 185). Por otra parte, utilizando este mismo modelo, inyectando LDL humana marcada con ^{99m}Tc se observó que el HLMC capta parte de las lipoproteínas marcadas circulantes siendo la radiactividad detectada en este tejido 1/5 de la registrada en hígado (186). Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de efectos adicionales del HLMC sobre la captación de LDL por otros tejidos (por ejemplo, vía la liberación de factores de crecimiento) atendiendo a lo reportado por Shiroeda y col. respecto a que una línea de células cancerosas de pulmón humano secretan factores que incrementan la actividad del receptor para LDL de otras células (187). Una hipótesis alternativa y relacionada con lo antes mencionado es que la hipocolesterolemia registrada en los animales portadores del tumor de pulmón humano sea la consecuencia de un incremento del catabolismo de las LDL a nivel hepático ocasionada por la presencia del tumor.

Además, se ha encontrado que los animales portadores de tumor tienen un contenido de colesterol hepático menor que los controles sin tumor (Figura III.6). Esta disminución en el contenido de colesterol sería la responsable del aumento de actividad HMG-CoA reductasa en hígado de portadores (Figura III.4) dado que, como se discutió previamente existe una relación inversa entre colesterol tisular y los niveles enzimáticos registrados.

La actividad de la HMG-CoA reductasa puede considerarse como una medida indirecta de la velocidad de síntesis endógena de colesterol. El incremento de la actividad de esta enzima en hígado de ratones nude portadores parece indicar que la presencia del tumor induce a un incremento de la síntesis de colesterol a nivel hepático. Esto está de acuerdo con el incremento de la incorporación de [¹⁴C] acetato en colesterol hepático ocasionado por la presencia del tumor reportado previamente en este mismo modelo (139).

El incremento de la síntesis, tomado conjuntamente con el decremento en el contenido de colesterol hepático y la hipocolesterolemia observada en los ratones huésped, conducen a sugerir dos hipótesis para explicar estas observaciones:

1- La presencia del tumor ocasiona un incremento del catabolismo del colesterol a nivel hepático que se traduce en una disminución del contenido de colesterol que sería el responsable del aumento en la actividad reductasa hepática y de un incremento en la captación de LDL plasmática que da por resultado la hipocolesterolemia observada.

2- Las células del carcinoma mucoepidermoide de pulmón humano satisfacen gran parte de sus necesidades de colesterol por activa captación de LDL plasmática ocasionando la hipocolesterolemia observada en animales huésped. La disminución de la concentración de LDL plasmática, que en condiciones fisiológicas, son mayoritariamente removidas a nivel hepático, es responsable del bajo contenido de colesterol hepático y de la elevada actividad HMG-CoA reductasa observada.

Desafortunadamente, ninguna de estas hipótesis puede ser descartada en base a los datos disponibles. Serían necesarios estudios de la cantidad de esteroides biliares excretados en materia fecal por los animales huésped y determinaciones de la actividad de receptores para LDL en el HLMC.

III.D.3. EFECTO DEL SIMVASTATIN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL HLMC DESARROLLADO EN RATONES NUDE, LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPÁTICO Y TUMORAL.

Las células cancerosas requieren grandes cantidades de colesterol y de intermediarios de su vía de síntesis que le permitan crecer, proliferar y replicarse a elevada velocidad. Un importante rasgo de la transformación maligna es la elevada velocidad de síntesis de colesterol (188). No obstante, en la mayoría de las líneas celulares tumorales los requerimientos de colesterol exceden substancialmente a la síntesis endógena y necesitan del colesterol del entorno para su supervivencia y crecimiento (189). Estas características comunes a la mayoría de las células neoplásicas han llevado a Henry Buchwald (190) a proponer la hipótesis de que una disminución de la disponibilidad de colesterol, ya sea por descenso del colesterol plasmático o por disminución de la síntesis intracelular del mismo, puede inhibir el crecimiento de células tumorales y ser utilizado como adyuvante para la quimioterapia del cáncer y posiblemente prevenir la carcinogénesis.

Por otra parte, como se mencionó previamente, el producto de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa, el mevalonato, es el precursor isoprenoides que son sustratos para la modificación postraduccional de un grupo de diversas proteínas celulares (proteínas preniladas) dentro del cual se encuentran las proteínas p21^{ras} codificadas por los genes *ras*. Estas proteínas que desempeñan una importante función en el normal crecimiento, proliferación y diferenciación de las

células eucarióticas están unidas a la superficie interior de la membrana plasmática a través del resto isoprenoide que se les adiciona postraduccionalmente. Una mutación simple del gen *ras* normal lo convierte en su forma oncogénica que se traduce en proteínas p21^{ras} alteradas (oncoproteínas) (96 - 98) que juegan un importante rol en el desarrollo de cánceres humanos (89). Dado que la asociación de las oncoproteínas p21^{ras} con la superficie interna de la membrana plasmática es requerida para su actividad transformante (99, 100), previniendo la prenilación de proteínas es posible inhibir el crecimiento de células tumorales *ras*- dependientes.

Como ya se dijo, se han aislado y purificado metabolitos fungales estrechamente relacionados, denominados genéricamente 'statins', capaces de inhibir competitivamente a la HMG-CoA reductasa.

La inhibición de la reductasa por los statins reduce la síntesis de colesterol y depleta los pools de este esteroide e intermediarios no esteroides, los cuales normalmente regulan negativamente la expresión de la enzima a nivel transcripcional, observándose una disminución de la actividad y un incremento de la cantidad de esta enzima en cultivo células y en animales al cabo de unas horas de tratamiento con algún statin (39, 123, 191 - 201). Otro resultado importante de la depleción del pool de esteroide es la regulación positiva que esto tiene sobre la síntesis del receptor para LDL, el cual tiende a compensar la baja síntesis de colesterol incrementando la captación de colesterol plasmático (37, 70, 202).

Además, se ha demostrado que la inhibición de la reductasa por statin puede inhibir la farnesilación de las proteínas p21^{ras} y consecuentemente su asociación a membrana celulares, aunque las concentraciones requeridas para inhibir la isoprenilación de proteínas son muy superiores a las necesarias para lograr una efectiva inhibición de la síntesis de colesterol (99, 100).

Por estas razones, la familia de los "statins", dentro de la cual se encuentra el Simvastatin, ha recibido en los últimos años una atención creciente por su potencial

capacidad de ser utilizados para el control del crecimiento de células tumorales (38, 190, 203).

La administración durante 33 días de una dosis de 50 mg/kg/día de Simvastatin suministrada a través del agua de bebida a ratones nude ocasiona un notable incremento de la cantidad de HMG-CoA reductasa hepática (Tabla III.4) pero no una disminución sostenida del colesterol plasmático (Tabla III.5). Esta falta de efecto hipocolesterolémico de los statins a largo plazo ha sido previamente reportada por Endo y col. en ratas y ratones tratados durante 5 semanas con Lovastatin (143). En estos animales, una simple dosis de statin inhibe la síntesis de colesterol hepática y disminuye el colesterol sérico dentro de un período de 2 a 3 horas (204), pero en la administración crónica durante 5 semanas se observó que la cantidad de proteína HMG-CoA reductasa se incrementa ante la continua exposición a su inhibidor competitivo y que la síntesis de colesterol hepático y el colesterol sérico no presentan disminuciones marcadas. A diferencia de lo observado en ratas y ratones, la administración crónica de lovastatin a hámster mantiene una disminución en el colesterol sérico a pesar de ocasionar una inducción de la HMG-CoA reductasa (200). Evidentemente los efectos in vivo de los statins son especie dependientes y varían con el tiempo de administración de la droga. Se ha sugerido que la falta de efecto neto de los statins sobre la colesterolemia en ratas y otras especies esta relacionado a la habilidad de las células para mantener la síntesis de esteroides por incremento de la concentración de la enzima HMG-CoA reductasa (205) y con la incapacidad de catabolizar las lipoproteínas plasmáticas preferentemente a nivel hepático (143).

El hecho de que en hígado y tumor de ratones nude portadores del HLHC tratados con Simvastatin se encuentre un notable incremento de la cantidad de HMG-CoA reductasa (Tabla III.4) y un contenido de colesterol tisular y microsomal no modificado (Tabla III.6) parece indicar que la droga fue efectivamente tomada por ambos tejidos y que la inducción de la enzima ocasionada en ellos por el

Simvastatin balancea su inhibición de modo que la síntesis de colesterol y el colesterol sérico no presentan disminuciones marcadas después de 33 días de administración de la droga. En esta situación no se encontraría disminuida la disponibilidad de colesterol exógeno ni la síntesis endógena de colesterol tumoral y por lo tanto, la restauración del equilibrio en la síntesis y homeostasis del colesterol alcanzado merced a la inducción de la reductasa hepática y tumoral sería la causa por la cual no se observa una disminución del crecimiento del HLMC al cabo del tratamiento crónico con Simvastatin (Tabla III.3 y Figura III.7).

Si bien existen trabajos experimentales que demuestran que inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa, como lovastatin y simvastatin, son efectivo en la disminución del crecimiento tumoral in vivo, estos resultados no son comparables con los aquí presentados porque difieren en las dosis de statin empleadas, en la vía de administración, en el tiempo de duración del tratamiento o bien se trata de células tumorales con una velocidad de crecimiento muy superior a la del HLMC. Maltese y col. han reportado que el crecimiento de un neuroblastoma puede ser inhibido en ratones sometidos a una infusión continua de dosis muy altas de lovastatin (5mg/kg/h equivalente a 120 mg/kg/día) (206). La administración de dosis tan altas para retardar el crecimiento tumoral han sido cuestionadas porque sus efectos tóxicos pueden estar ligados con los resultados hallados (207). Sebti y col. encuentran una disminución del crecimiento de células transformadas con el oncogen humano H-*ras* en ratones nude al cabo de 12 días de tratamiento con una dosis de 50 mg/kg/día de Lovastatin administrada intraperitonealmente (141). Los tumores desarrollados por el implante subcutáneo de esas células *ras*-transformadas duplican su tamaño, en fase exponencial de crecimiento en sólo dos días mientras que el HLMC lo hace en 8-10 días. La dosis empleada fue la misma que la utilizada en nuestros experimentos, pero la vía de administración intraperitoneal permite la obtención de una mayor concentración plasmática de la droga dado que sólo aproximadamente el 30 % del statin suministrado oralmente se absorbe (208).

En hígado de ratones no portadores se observa que al cabo del tratamiento con Simvastatin persiste una disminución del contenido de colesterol tisular y microsomal (Tabla III.6) pese a que la inducción de la reductasa es más marcada que en portadores (Tabla III.4). Esto estaría indicando que en hígado de animales no portadores no se habría alcanzado al cabo de 33 días el equilibrio entre inducción e inhibición. De modo que, la presencia del tumor parece atenuar el efecto de la droga sobre el hígado del huésped. Esto podría deberse a que una importante cantidad del inhibidor circulante puede ser captada por el tumor en función de su elevada masa relativa respecto del resto de los órganos del animal.

CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL
COLESTEROL EN UN HEPATOBLASTOMA HUMANO EN
CULTIVO: EFECTOS DEL ETANOL RELACION ENTRE
COLESTEROGENESIS Y CRECIMIENTO CELULAR.

ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL EN UN HEPATOBLASTOMA HUMANO EN CULTIVO: EFECTOS DEL ETANOL. RELACIÓN ENTRE COLESTEROGÉNESIS Y CRECIMIENTO CELULAR.

El etanol es un compuesto de alto valor energético (7,1 Cal / g) que si bien puede ser sintetizado endógenamente en cantidades trazas, es fundamentalmente un compuesto exógeno que es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal. Sólo el 2 a 10 % de lo que se absorbe es eliminado a través de pulmones y riñones; el resto es oxidado en el organismo. El hígado es el único órgano capacitado para oxidar esta sustancia, siendo de esta forma responsable de la eliminación de aproximadamente el 90 % del etanol del organismo (209). Se sabe que el consumo de etanol ocasiona una alteración de la homeostasis de los lípidos, fundamentalmente a nivel hepático, y es responsable del daño hepático progresivo que puede conducir al desarrollo de hepatitis y cirrosis en los alcohólicos crónicos (210).

En los experimentos de este capítulo se estudiaron primero algunas propiedades cinéticas y de regulación de la HMG-CoA reductasa en células Hep G2 y luego se analizó el efecto del etanol sobre el crecimiento, actividad de la HMG-CoA reductasa y homeostasis del colesterol de esta línea celular desarrollada a partir de un hepatoblastoma humano.

IV.A. PROPIEDADES DE LA HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2 EN FASE LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO.

La determinación de alguna de las propiedades de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2 fue realizada a los efectos de evaluar la utilidad de este modelo de células hepáticas en cultivo para el estudio de la influencia del etanol sobre la

actividad de la reductasa hepática humana e indirectamente sobre la síntesis de colesterol.

Se realizó la caracterización cinética de la HMG-CoA reductasa en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento (en presencia y ausencia de suero fetal en el medio de cultivo), etapa previa imprescindible que permitió asegurar que en las condiciones de ensayo propuestas la actividad registrada depende exclusivamente de la cantidad de enzima presente en el medio de incubación. Habiendo chequeado previamente las condiciones de ensayo, se analizó cómo se modifica la actividad enzimática específica en estas células cuando son incubadas en presencia de LDL o mevalonato, siendo ambos factores conocidos por modular la actividad reductasa de las células hepáticas normales.

IV.A.1. CARACTERIZACIÓN DE LA HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2.

Para realizar los experimentos de caracterización se sembraron aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células en botellas de 95 cm^2 de área de pegado, utilizando como medio de cultivo MEM con 10 % de suero fetal bovino. Las botellas se dejaron en estufa a 37°C durante 72 horas, al cabo de las cuales el medio se cambió por medio fresco (MEM con suero fetal) y se dejó nuevamente a 37°C durante 24 horas. Luego el medio fue reemplazado en la mitad de las botellas por IMEM Zo con 10 % de suero fetal y en el resto por medio sin suero (IMEM Zo). Las botellas se colocaron en estufa a 37°C durante 24 horas. Finalmente, las células removidas de las botellas de cada uno de los lotes fueron recogidas conjuntamente y luego procesadas para obtener la suspensión celular homogeneizada por sonicación (ver ítem II.B.2.c.).

Utilizando esta suspensión celular sonicada de pool de células como fuente de enzima se determinó la síntesis de mevalonato en las condiciones standard descriptas en el ítem II.B.3.a pero adicionando cantidades variables de sustrato o de proteína celular al medio de incubación.

La velocidad de síntesis de mevalonato determinada utilizando distintas concentraciones de sustrato en el medio de incubación se muestran en la Tabla IV.1.

TABLA IV.1.

ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA DETERMINADA USANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO EN EL MEDIO DE INCUBACIÓN.

La actividad enzimática fue determinada en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento incubadas durante las últimas 24 horas en medios con y sin suero fetal. Los análisis fueron realizados por el método standard descrito excepto por los cambios indicados en la concentración de DL-hidroximetilglutaril CoA. Los valores representan promedios de análisis realizados por triplicado utilizando alícuotas de la suspensión del pool de células homogeneizadas por sonicación conteniendo 100 µg de proteína.

Concentración de HMG-CoA en el medio de incubación (µM)	Actividad HMG-CoA reductasa (pmoles/min/mg prot. celular)	
	Con Suero Fetal	Sin Suero Fetal
44	79,1	226,8
88	89,3	270,9
176	99,3	295,4
352	112,1	312,4

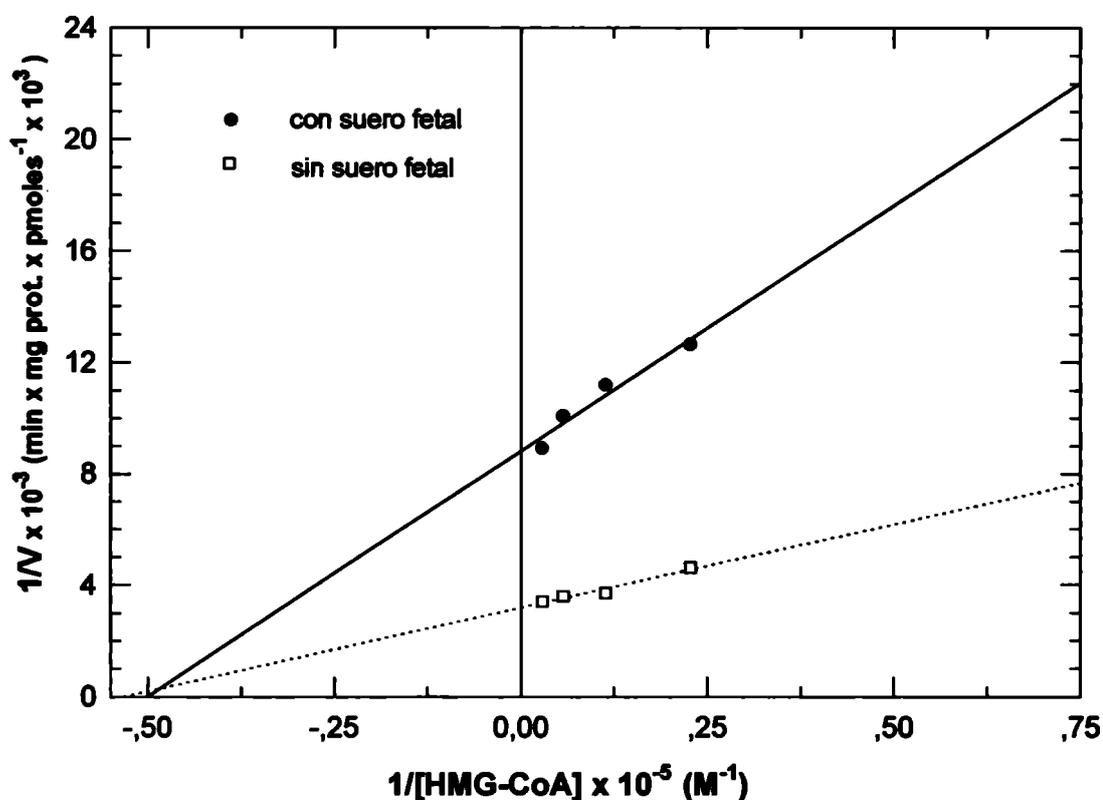
Cuando la concentración de sustrato ensayada fue 1/4x; 1/2x; x y 2x de la standard (176 µM), se observaron pequeños incrementos en la velocidad de síntesis de mevalonato que acompañan al aumento de la cantidad de HMG-CoA presente sin que exista una relación lineal entre ellos.

Utilizando los datos de la tabla IV.1 y trazando la doble recíproca de Lineweaver-Burk fue posible calcular la constante de Michaelis-Menten aparente (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). Los resultados se muestran en la Figura IV.1, donde puede observarse que la incubación durante 24 horas en un medio sin suero fetal se traduce en un notable incremento de la velocidad máxima sin modificación en el valor de la constante de Michaelis-Menten encontrada.

Cuando distintas cantidades de proteína fueron adicionadas al medio de incubación en presencia de una concentración fija de sustrato (176 μ M) se observó que la velocidad de síntesis de mevalonato es proporcional a la cantidad de enzima en el rango de proteína celular ensayado aún cuando la suspensión celular homogeneizada utilizada como fuente de enzima fue obtenida de células que presentan una elevada actividad enzimática como las incubadas en ausencia de suero fetal (Fig. IV.2). Los datos pudieron ajustarse por análisis de regresión a una recta del tipo: $y = b + ax$, donde b corresponde al blanco de reactivos ensayado (de 4,04 pmoles de mevalonato/min.) y $r^2 > 0,97$ en ambos casos.

FIGURA IV.1.

CURVA DE LINEWEAVER-BURK PARA HMG-CoA REDUCTASA DE HEP G2.

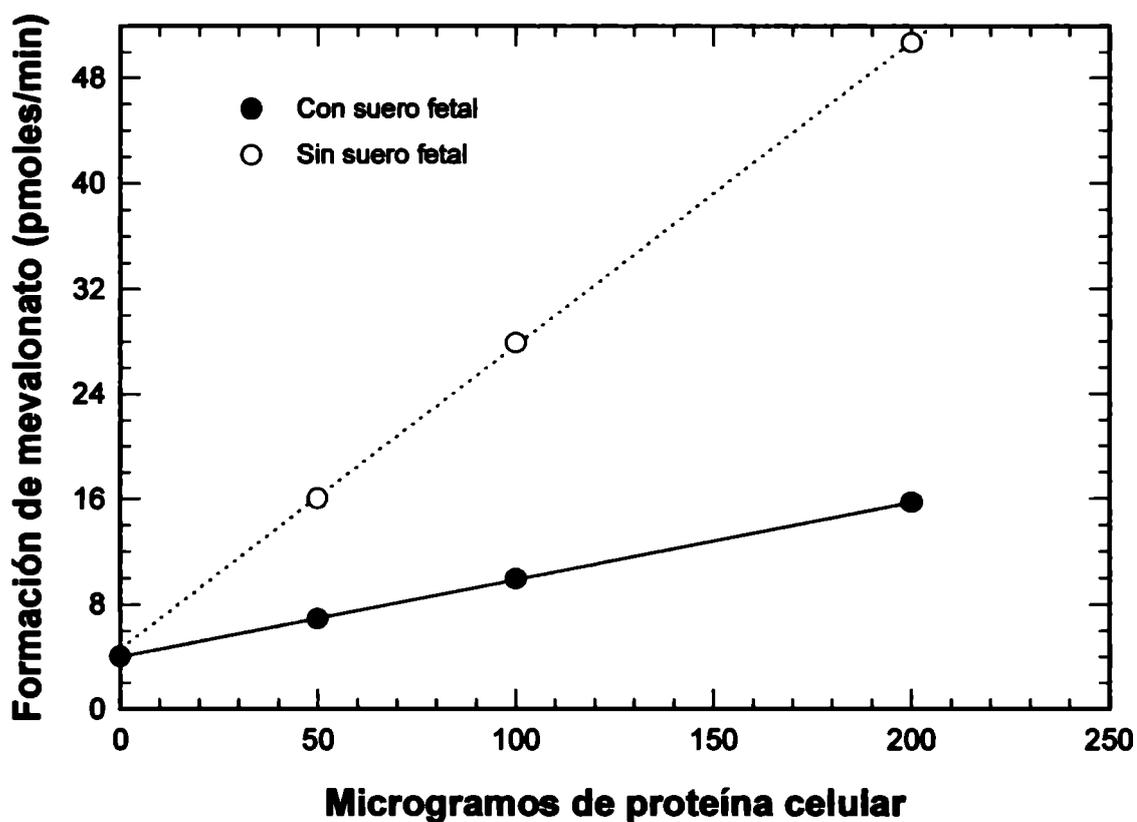


Los datos representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado con las concentraciones de HMG-CoA indicadas, 100 μg de proteína celular y las restantes condiciones standard descritas en ítem I.B.3.a. Las constantes cinéticas calculadas a partir de la curva de Lineweaver-Burk ajustando los datos por análisis de regresión a rectas del tipo $y = b + ax$, son: $K_m = 1,99 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V_{max} = 113,20 \text{ pmoles por min por mg}$ para la reductasa de células incubadas con suero fetal en el medio y $K_m = 1,88 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V_{max} = 314,01 \text{ pmoles por min por mg}$ para células incubadas en medio sin suero fetal. El coeficiente de correlación lineal (r^2) fue mayor de 0,95 en ambos casos.



FIGURA IV.2.

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA SOBRE LA SÍNTESIS DE MEVALONATO EN CÉLULAS HEP G2 EN FASE LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO.



Alícuotas de suspensión de pool de células homogeneizadas por sonicación conteniendo las cantidades indicadas de proteína fueron incubadas y analizadas como se describe en "Materiales y Métodos". Los datos representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado.

IV.A.2. EFECTO DEL MEVALONATO SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA EN CÉLULAS HEP G2 INCUBADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE SUERO FETAL.

Para la realización de este experimento se dispuso de células incubadas en medios con y sin suero fetal como se describe en el ítem IV.A.1. pero a la mitad de las botellas de cada uno de estos grupos se le adicionó mevalonato a una concentración final de 0,5 mM durante las últimas 24 horas de tratamiento. El mevalonato fue obtenido tratando mevalonolactona (Sigma) con NaOH 0,1 M a 56°C durante 15 minutos.

Finalizado el tratamiento, las células fueron removidas de las botellas y procesadas para obtener la suspensión celular homogeneizada por sonicación. El ensayo de actividad HMG-CoA reductasa se realizó en las condiciones standard descritas en el ítem I.B.3.a utilizando la suspensión celular sonicada como fuente de enzima y haciéndose cada determinación por duplicado.

La adición de mevalonato al medio condicionado tanto en presencia como en ausencia de suero fetal ocasionó una significativa disminución de la actividad HMG-CoA reductasa (Tabla IV.2).

TABLA IV.2.

EFFECTO DEL MEVALONATO SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA EN CÉLULAS HEP G2 CULTIVADAS EN MONOCAPA.

La actividad enzimática fue determinada en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento incubadas durante las últimas 24 horas en medios con o sin suero fetal y en presencia o ausencia de mevalonato. Los análisis fueron realizados en las condiciones standard descriptas en "Materiales y Métodos". Los valores representan promedio \pm 1SD de cuatro determinaciones realizadas por duplicado utilizando alícuotas de la suspensión de células homogeneizadas por sonicación conteniendo 100 μ g de proteína.

Tratamiento	Actividad HMG-CoA reductasa (pmoles/min/mg prot. celular)
Sin Suero:	
Control	274,51 \pm 51,20
Mevalonato	105,43 \pm 22,18 *
Con Suero:	
Control	111,82 \pm 9,93
Mevalonato	36,13 \pm 5,70 *

Significativamente diferente respecto al control correspondiente: * $p < 0,001$

IV.B. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS HEP G2 EN CULTIVO EN MONOCAPA.

Este experimento se realizó a los efectos de analizar las alteraciones en el patrón de crecimiento celular ocasionadas por el etanol en las condiciones experimentales que utilizaríamos en los experimentos subsiguientes.

Para la realización de este experimento se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en botellas de cultivo chicas (50 cm^2 de área de pegado) conteniendo medio MEM con 10 % de suero fetal (5 ml). Se incubaron durante 72 horas manteniéndolas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Cumplido ese lapso de tiempo se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por medio fresco. Al medio de cultivo de un grupo de botellas se le adicionó etanol absoluto a una concentración final de 400 mM, constituyendo éstas el lote etanol (E). Las restantes botellas no recibieron suplemento alguno y se las consideró lote control (C). El recambio del medio de cultivo se realizó cada 24 horas manteniendo las condiciones de tratamiento. Diariamente se tomaron tres botellas de cada lote a las que se extrajeron delicadamente las células con tripsina. Las células se pasaron a tubos de ensayo para centrifugarlas a baja velocidad (500 rpm) durante 5 minutos, y lavarlas tres veces con solución fisiológica a los efectos de extraer la tripsina. Las células fueron digeridas y sus proteínas cuantificadas como está descrito en “Materiales y Métodos”.

A las células de las botellas tomadas para la medición de proteínas a las 48 horas de tratamiento se les estimó previamente la viabilidad celular como se describe en el ítem II.B.2.b.

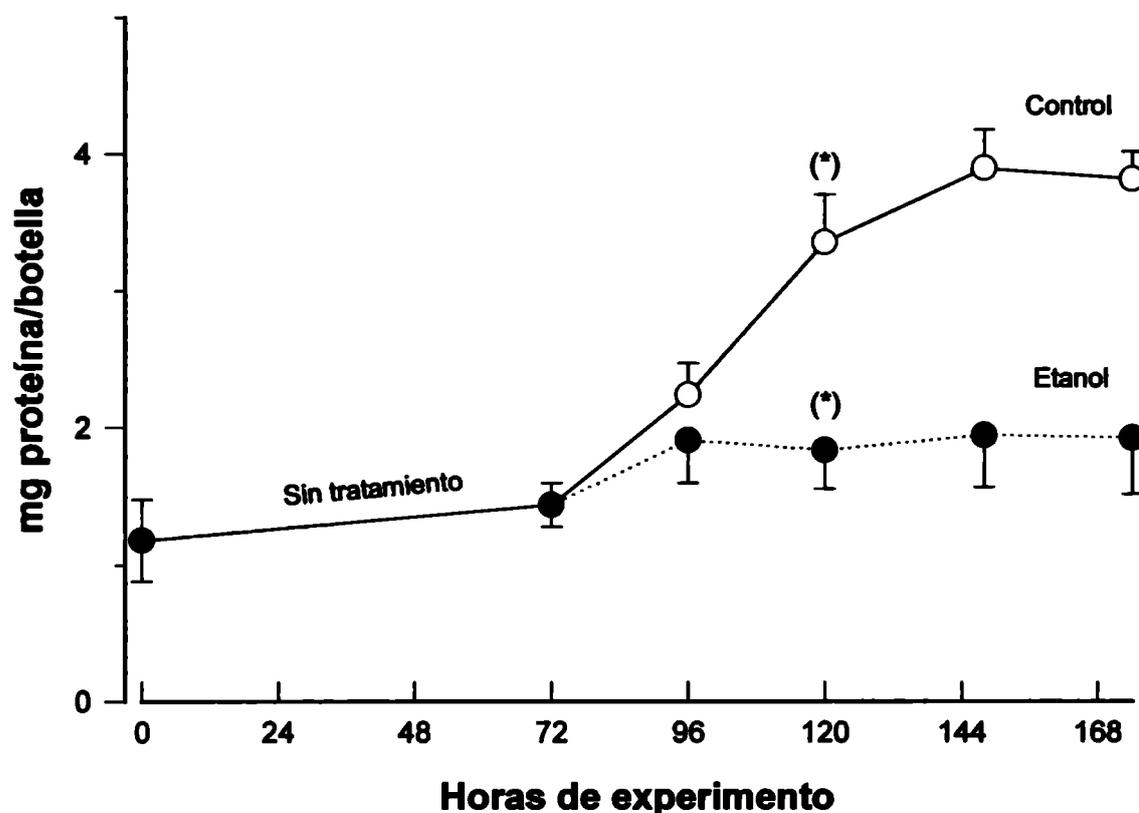
La curva de crecimiento obtenida se muestra en la Figura IV.3. Estas células presentan un período lag de aproximadamente 72 horas, durante el cual las mismas prácticamente no se dividen. En el gráfico puede observarse que las células tratadas con etanol (400 mM) parecen no salir del lag ya que no se encontró un aumento significativo de la cantidad de proteína celular total por botella.

El test de viabilidad realizado a las células de ambos lotes a las 48 horas de tratamiento muestra que permanecen viables al menos el 90 % de las células.

El análisis microfotográfico realizado a las 48 horas de tratamiento (Fig. IV.4a y b) muestra que estas células crecen a modo de aglomerados celulares y que no presentan inhibición por contacto. Se forman capas de células dobles o triples, lo que hace muy difícil a veces enfocar la imagen. Sin embargo este tipo de fotografías realizadas sin coloración permite observar que las células del lote "etanol" no presentan diferencias morfológicas con las del lote "control"; sólo se observa una densidad celular menor compatible con una disminución de la proteína celular total por botella (Fig. IV.4).

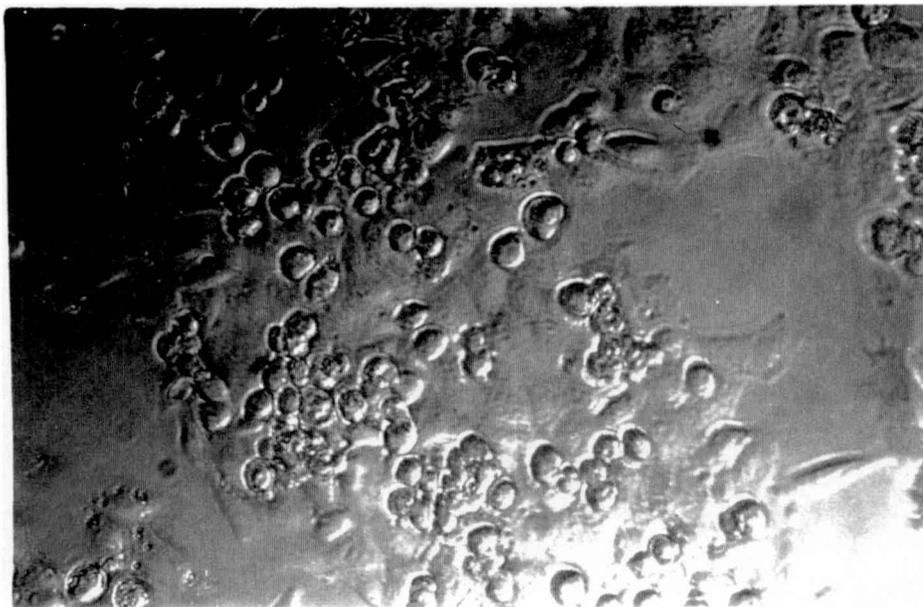
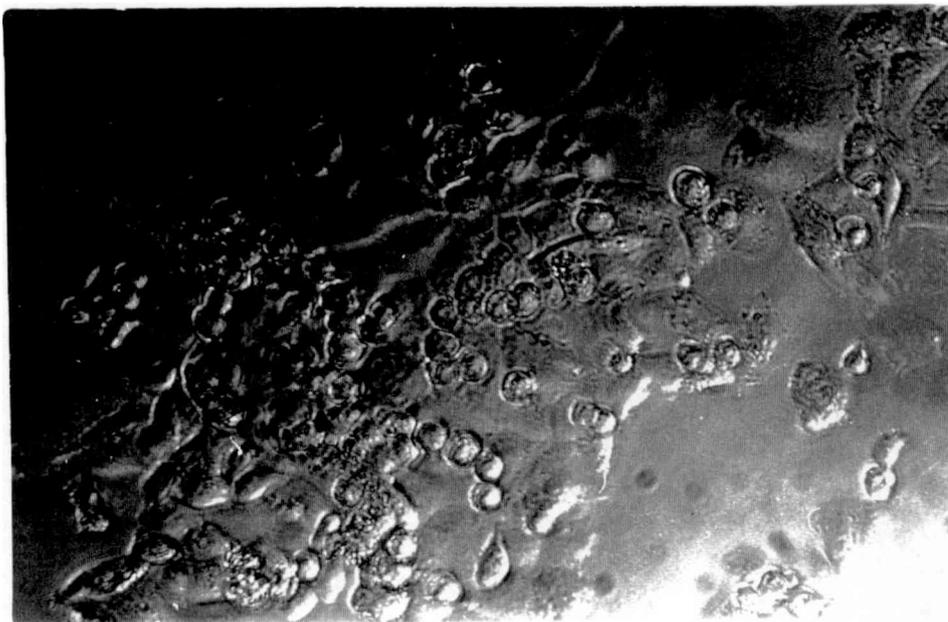
FIGURA IV.3.

CURVA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS HEP G2. EFECTO DEL ETANOL.



Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en botellas de 50 cm^2 de superficie de pegado con 5 ml de medio MEM con 10 % de suero fetal. A las 72 horas de experimento se recambia el medio de incubación por otro suplementado como se detalla en el ítem IV.A. Esto último se realizó diariamente hasta el final del experimento. Las muestras para análisis de proteína celular total se tomaron cada 24 horas y se procesaron como se detalla en el ítem IV.A. Los resultados son la media de tres determinaciones $\pm 1 \text{ SD}$.

(*) : viabilidad $\geq 90 \%$ (Test de Azul Tripan).

FIGURA IV.4.**ASPECTO MICROSCÓPICO DE CÉLULAS HEP G2. EFECTO DEL ETANOL****a) Lote Control****b) Lote Etanol**

IV.C. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y EL CONTENIDO DE COLESTEROL EN CÉLULAS HEP G2 EN CULTIVO EN MONOCAPA. RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CRECIMIENTO CELULAR.

En todos los experimentos realizados para analizar el efecto del etanol sobre la actividad HMG-CoA reductasa de células Hep G2, las células fueron sometidas a un tratamiento básico inicial similar.

Se sembraron aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células en botellas de 95 cm² de área de pegado, utilizando como medio de cultivo MEM con 10 % de suero fetal bovino. Las botellas se dejaron en estufa a 37°C durante 72 horas. Al cabo de este tiempo las botellas fueron separadas en dos lotes principales: control (C) y etanol (E). En ambos lotes se utilizó MEM con 10 % de suero fetal como medio de cultivo pero al lote (E) se le adicionó etanol. Después de 24 horas en estufa a 37 °C se descartó el medio y se reemplazó por medio IMEM Zo sin suero, adicionando al lote (E) idéntica concentración de etanol a la previamente usada. Las células se incubaron en este medio durante 24 horas a 37 °C.

IV.C.1. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA, CONTENIDO DE COLESTEROL Y CRECIMIENTO CELULAR EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.

En este experimento las células del lote (E) fueron tratadas con concentraciones de etanol entre 50 y 400 mM.

Al cabo del tratamiento, se removió el medio de incubación con pipetas Pasteur, se transfirió a balones de 125 ml de capacidad y se liofilizó en un liofilizador Virtis. El medio liofilizado fue saponificado y se extrajeron lípidos insaponificables.

Las células fueron removidas de las botellas obteniéndose una suspensión celular. Sobre sendas alícuotas de esta suspensión se procedió a determinar la cantidad de proteína celular total, extraer los lípidos insaponificables celulares y homogeneizar las células por sonicación, empleando en cada caso la metodología descrita en “Materiales y Métodos”.

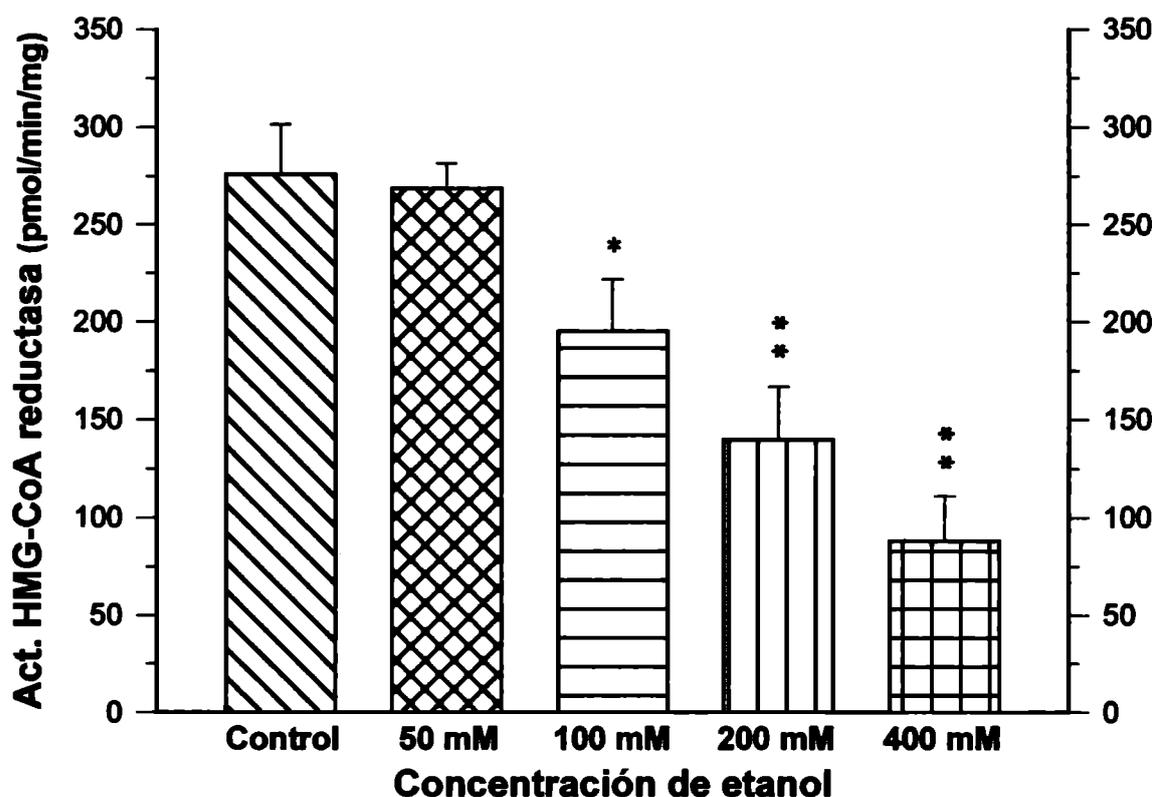
Utilizando suspensión celular sonicada como fuente de enzima se determinó la actividad HMG-CoA reductasa en las condiciones de ensayo standard descritas en el ítem II.B.3.a.

Los lípidos insaponificables extraídos de medios y células fueron utilizados para cuantificar colesterol por GLC en condiciones isotérmicas (ver ítem II.B.3.d).

La adición de etanol al medio condicionado ocasionó una disminución de la actividad HMG-CoA reductasa celular dosis dependiente (Fig. IV.5). Se encontró un efecto similar en la cantidad de proteína celular total, aunque en este caso es menos pronunciado y sólo estadísticamente significativo cuando la concentración de etanol usada fue de 400 mM, (Fig. IV.6). Por otra parte, el contenido de colesterol tanto de medio como de células no fue modificado por el tratamiento con las distintas concentraciones de etanol (Tabla IV.3).

FIGURA IV.5.

EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2 CULTIVADAS EN MONOCAPA.

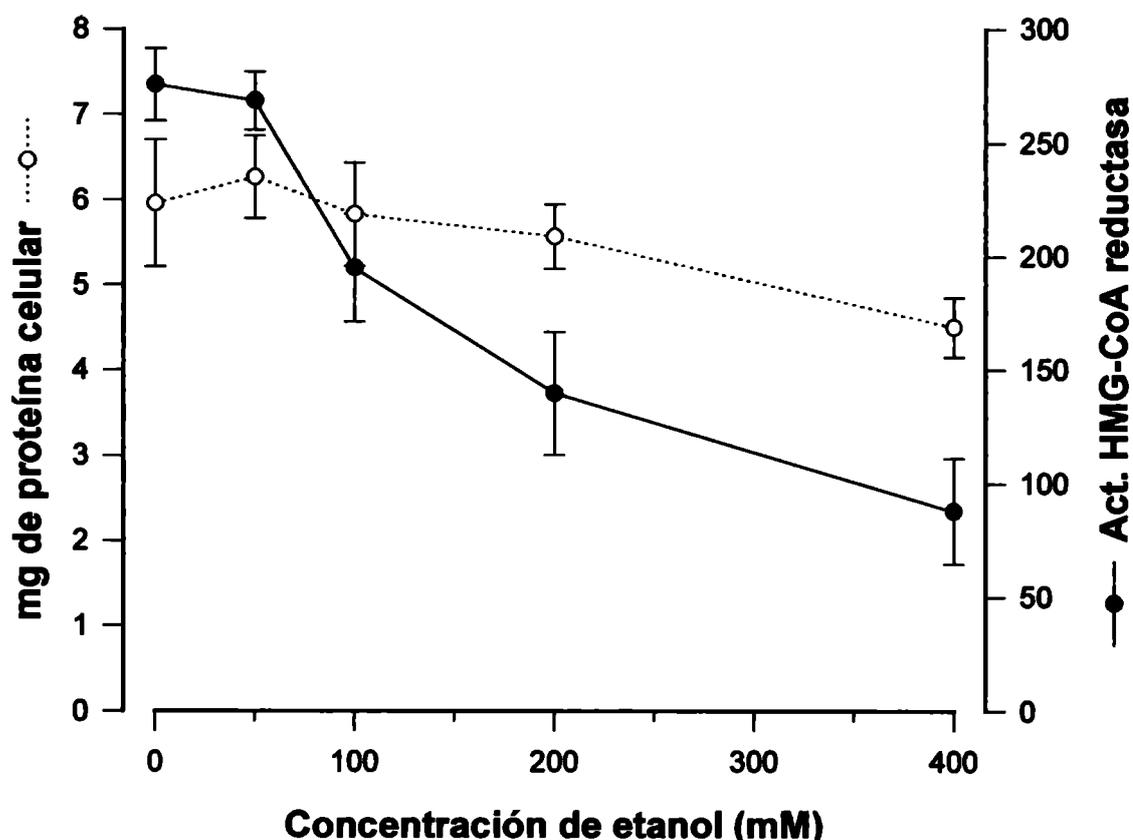


La actividad HMG-CoA reductasa se determinó en las condiciones standard descritas en "Materiales y Métodos" utilizando suspensión celular sonicada de células Hep G2 cosechadas luego de 48 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas de etanol. Los datos representan el promedio \pm 1 SD de tres determinaciones realizadas por duplicado.

(*) $p < 0,02$ y (**) $p < 0,001$ respecto al control.

FIGURA IV.6.

VARIACIONES DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA CELULAR Y DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2 POR LA ADICIÓN DE CANTIDADES CRECIENTES DE ETANOL AL MEDIO DE CULTIVO.



La cantidad de proteína celular total y la actividad HMG-CoA reductasa fue determinada en células Hep G2 cosechadas luego de 48 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas de etanol. Los datos representan el promedio \pm 1 SD de tres determinaciones realizadas por duplicado.

TABLA IV.3.

CONTENIDO DE COLESTEROL CELULAR Y DEL MEDIO CONDICIONADO EN CULTIVO DE CÉLULAS HEP G2 TRATADAS CON ETANOL.

El contenido de colesterol de células y del medio condicionado sin suero fue determinado en cultivos de células Hep G2 luego de 48 horas de tratamiento con distintas dosis de etanol. Los valores representan promedios \pm 1 SD de tres determinaciones.

Tratamiento	μg de colesterol / mg proteína celular	
	Células	Medio condicionado
Control	17,66 \pm 2,98	2,00 \pm 0,17
Etanol 50 mM	18,37 \pm 1,12	2,05 \pm 0,25
Etanol 100 mM	17,77 \pm 2,61	2,18 \pm 0,31
Etanol 200 mM	16,96 \pm 2,67	2,19 \pm 0,49
Etanol 400 mM	16,29 \pm 1,12	2,30 \pm 0,51

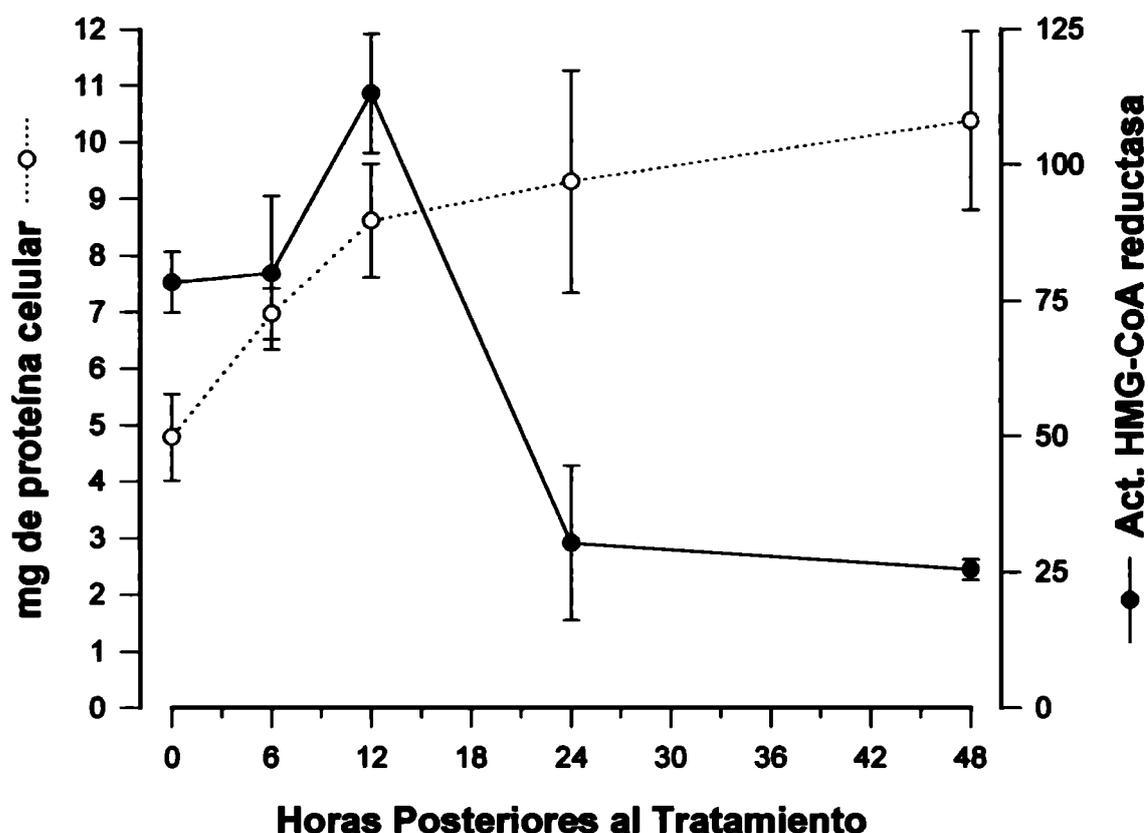
IV.C.2. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y CRECIMIENTO CELULAR EN LAS HORAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO CON ETANOL.

Este experimento se realizó a los efectos de analizar como evolucionan los cultivos celulares en las horas posteriores al tratamiento con etanol. En el tratamiento básico inicial se adicionó a botellas del lote (E) una concentración 400 mM de etanol. Al cabo de las 48 horas de exposición, se eliminó el medio, se lavaron las células tres veces con 10 ml de IMEM Zo y se adicionó a cada botella 15 ml de MEM con 10 % de suero fetal bovino. Las células fueron removidas a distintos tiempos a lo largo de las 48 horas posteriores al tratamiento y procesadas para obtener la suspensión celular homogeneizada por sonicación. Se determinó la cantidad de proteína celular total y la actividad HMG-CoA reductasa en cada caso como se describe en “Materiales y Métodos”.

En las primeras 12 horas posteriores al tratamiento con etanol se encontró un incremento tanto de la actividad como de la cantidad de proteína celular total. Luego de este tiempo, la cantidad de proteína celular total permaneció aproximadamente constante y la actividad enzimática registrada cayó marcadamente (Fig. IV.7).

FIGURA IV.7.

PROTEÍNA CELULAR Y ACTIVIDAD REDUCTASA EN LAS HORAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO CON ETANOL.



Células Hep G2 cultivadas en monocapa fueron tratadas con etanol 400 mM durante 48 horas. Luego el medio fue reemplazado por medio fresco con suero y a los tiempos indicados fueron procesados grupos de tres botellas para determinar proteína celular total y actividad HMG-CoA reductasa como se describe en "Materiales y Métodos". La actividad reductasa fue expresada como pmoles de mevalonato / min / mg de proteína celular. Los datos representan el promedio \pm 1 SD de tres determinaciones realizadas por duplicado.

IV.C.3. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS TRATADAS CON ETANOL EN PRESENCIA DE MEVALONATO.

En este experimento las células del lote (E) fueron tratadas con 400 mM de etanol. Para evaluar el efecto del mevalonato, producto de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa, sobre la disminución del crecimiento y de la actividad HMG-CoA reductasa ocasionados por el etanol se introdujeron dos lotes adicionales: lote mevalonato (M) y lote etanol + mevalonato (E+M) en los cuales se adicionó al medio de cultivo mevalonato (0,5 mM) y etanol (400 mM) más mevalonato (0,5 mM), respectivamente.

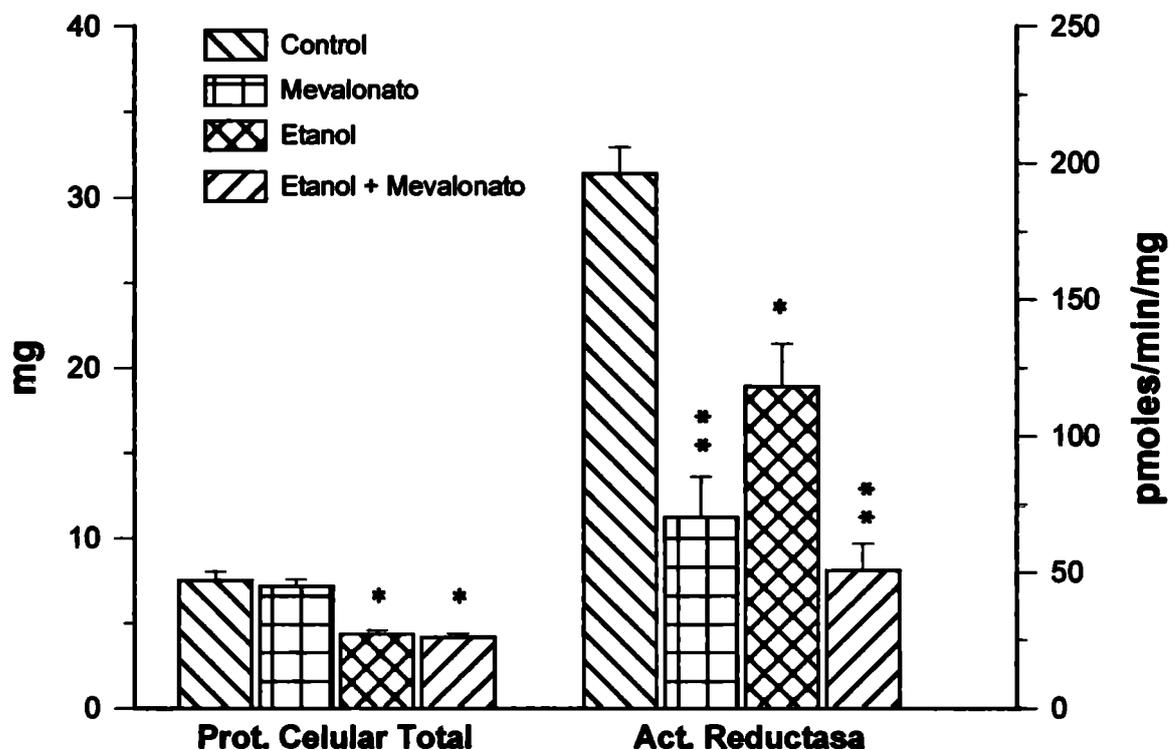
Al cabo del tratamiento, se eliminó el medio, las células fueron lavadas con solución fisiológica fría, removidas de las botellas con espátula de goma y procesadas para obtener la suspensión celular sonicada. Sobre alícuotas de la suspensión celular se determinó proteína celular total y actividad HMG-CoA reductasa en las condiciones descritas en “Materiales y Métodos”.

En el lote mevalonato (M) se encontró una disminución del 64 % en la actividad HMG-CoA reductasa sin que exista modificación en la cantidad de proteína celular total respecto del lote control (C) (Fig. IV.8).

En los lotes etanol (E) y etanol más mevalonato (E+M) se observó una disminución de la actividad reductasa del 40 % y 74 % respectivamente. La adición de mevalonato no logró revertir la inhibición del crecimiento ocasionada por el etanol (400 mM) observándose una disminución de la cantidad de proteína celular total similar en ambos lotes (Fig. IV.8).

FIGURA IV.8.

EFECTO DE LA ADICIÓN DE MEVALONATO SOBRE LA ACTIVIDAD REDUCTASA Y EL CRECIMIENTO CELULAR EN CÉLULAS HEP G2 CONTROL Y TRATADAS CON ETANOL.



Al cabo de 48 horas de tratamiento las células de los distintos lotes fueron procesadas para determinar proteína celular total y actividad HMG-CoA reductasa como se describe en "Materiales y Métodos". Los datos representan el promedio \pm 1 SD de cuatro determinaciones realizadas por duplicado.

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

IV.D. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA SÍNTESIS DE COLESTEROL Y ÁCIDOS GRASOS Y SU ELIMINACIÓN AL MEDIO CONDICIONADO.

IV.D.1. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA INCORPORACIÓN DE ACETATO ¹⁴C EN COLESTEROL Y ÁCIDOS GRASOS CELULARES Y DEL MEDIO CONDICIONADO EN CÉLULAS HEP G2.

Como una medida indirecta de la síntesis y eliminación al medio condicionado de colesterol y ácidos grasos se procedió a determinar la incorporación de acetato ¹⁴C en estos lípidos tanto en célula como en medio de cultivo.

Para la realización de este experimento se sembraron $2,5 \times 10^6$ células en botellas de 95 cm² de superficie de pegado, utilizando MEM con 10 % de suero fetal bovino. Se colocaron en estufa a 37°C durante 72 horas. Pasado este tiempo, se cambió el medio por otro idéntico fresco y a un grupo de botellas, que pasó a denominarse lote etanol (E), se le adicionó etanol a una concentración final 400 mM mientras que el resto de las botellas no recibieron suplemento alguno y se denominaron lote control (C). Las células fueron incubadas en estas condiciones durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se eliminó el medio, las células fueron lavadas tres veces con solución fisiológica estéril, se agregaron 15 ml de medio sin suero (IMEM Zo) y sin rojo de fenol más 3 μCi de ¹⁴C acetato. A las células del lote (E) se les agregó además etanol (400 mM). Las células se dejaron en estufa por otras 24 horas. Cumplido este tiempo, se recogió el medio por aspiración con pipetas Pasteur, se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 minutos para precipitar células y detritos, pasándolo luego a balones para ser liofilizado.

Las células fueron removidas con espátula de goma, se transfirieron a tubos de vidrio y se llevaron a volumen conocido con solución fisiológica para tomar una alícuota del suspendido celular y procesarla para cuantificación de proteínas (ver Materiales y Métodos). El resto se centrifugó a baja velocidad y se descartó el sobrenadante.

El pellet de células y el medio liofilizado fueron saponificados y se extrajeron lípidos insaponificables y ácidos grasos totales con éter de petróleo (ver Materiales y Métodos). Una alícuota del extracto etéreo de ácidos grasos totales fue tomada para la cuantificación de radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido.

El colesterol y sus precursores presentes en el extracto de lípidos insaponificable fueron separados por cromatografía en capa fina como se describe en el ítem II.B.3.c. Finalizada la TLC, fue raspada de la placa la región correspondiente al colesterol, la sílica se recogió en viales conteniendo líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad presente en este esterol utilizando un contador de centelleo líquido. Una alícuota de extracto etéreo de lípidos insaponificables fue utilizada para determinación de contenido de colesterol por GLC (ver ítem II.B.3.d)

Los resultados correspondientes a la incorporación ^{14}C acetato en ácidos grasos totales y en colesterol son los presentados en las Tablas IV.4 y IV.5.

El tratamiento con etanol ocasionó una disminución de la cantidad total de marca incorporada (DPM células + DPM en medio) en ácidos grasos totales y colesterol del 52,5 % y 62,9 % respectivamente. Esta disminución fue debida en ambos casos a un significativo descenso de la marca encontrada en estos lípidos en células.

TABLA IV.4.

INCORPORACIÓN DE ACETATO ¹⁴C EN EL COLESTEROL CELULAR Y DEL MEDIO CONDICIONADO EN CÉLULAS HEP G2. EFECTO DEL ETANOL.

Las células tratadas como se detalla en el texto del ítem IV.D.1 se incubaron en presencia de acetato ¹⁴C durante 24 horas. Las células y el medio liofilizado se procesaron para la extracción de lípido insaponificables y la separación del colesterol por TLC determinándose finalmente la radiactividad incorporada en él. Los resultados son la media \pm 1 SD de tres determinaciones.

Tratamiento	Radiactividad en colesterol (DPM/mg de proteína)		
	Células	Medio	Total (células + medio)
Control	21301 \pm 4744	879 \pm 398	22201 \pm 5060
Etanol 400 mM	7760 \pm 2419 *	470 \pm 136	8230 \pm 2554 *

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

TABLA IV.5.

INCORPORACIÓN DE ACETATO ¹⁴C EN LOS ÁCIDOS GRASOS CELULARES Y DEL MEDIO CONDICIONADO EN CÉLULAS HEP G2. EFECTO DEL ETANOL.

Las células tratadas como se detalla en el texto del ítem IV.D.1 se incubaron en presencia de acetato ¹⁴C durante 24 horas. Las células y el medio liofilizado se saponificaron. Los ácidos grasos totales fueron extraídos como se describe en "Materiales y Métodos" y una alícuota fue utilizada para la determinación de la radiactividad incorporada en ellos. Los resultados son la media \pm 1 SD de tres determinaciones.

Tratamiento	Radiactividad en ácidos grasos (DPM/mg de proteína)		
	Células	Medio	Total (células + medio)
Control	340445 \pm 38114	5359 \pm 1537	345804 \pm 37205
Etanol 400 mM	156063 \pm 19441 *	8208 \pm 2911	164271 \pm 20413 *

(*) $p < 0,001$ respecto al control.

Como una aproximación para testear la eliminación tanto de colesterol como de ácidos grasos se calculó el porcentaje de marca exportada al medio de cultivo como: $(\text{DPM medio} / \text{DPM medio} + \text{DPM células}) \times 100$ y los resultados son los mostrados en la Figura IV.9. Se encontró que en el lote de células tratadas con etanol existe un aumento de la cantidad relativa de marca exportada al medio del 49,3 % en colesterol y del 215,2 % en ácidos grasos totales, respecto al lote control.

Al igual que en el experimento descrito en el ítem IV.C.1, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de colesterol de células y medio a causa del tratamiento con etanol 400 mM. Los valores promedio \pm SD de cuatro determinaciones de colesterol en células y medio del lote control fueron: $16,12 \pm 2,87$ y $1,86 \pm 0,49$ $\mu\text{g} / \text{mg}$ de proteína; en el lote etanol los resultados fueron $15,30 \pm 3,06$ y $2,61 \pm 0,71$ μg de colesterol / mg de proteína para células y medio respectivamente.

IV.D.2. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ELIMINACIÓN DE COLESTEROL AL MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS HEP G2.

Este experimento se realizó para analizar el destino que tiene el colesterol incorporado previamente desde el medio cuando las células son sometidas al tratamiento con etanol.

Para ello se sembraron $2,5 \times 10^6$ células en botellas de cultivo de 95 cm^2 de superficie de pegado y se incubaron en 15 ml de medio MEM con 10 % de suero fetal durante 48 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Al cabo de este tiempo, se removió el medio de incubación y se reemplazó por otro sin suero (IMEM Zo) con el agregado de colesterol ^3H (0,2 nmoles y 10 μCi por botella) disuelto en etanol. Después de 24 horas de incubación con el material marcado se removió el medio. En este punto se apartó un lote suplementario denominado "Control de Incorporación". Las células

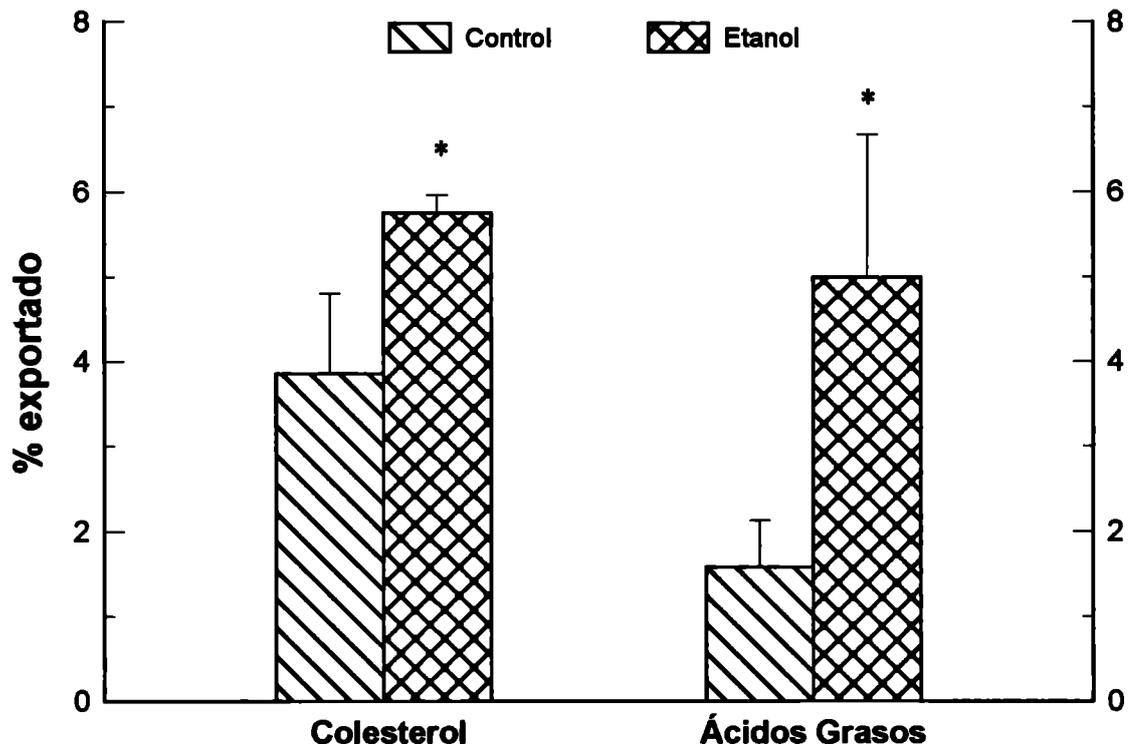
de las botellas de este lote fueron lavadas con solución fisiológica (tres veces) y se removieron con espátula de goma transfiriéndolas a tubos de vidrio para ser procesadas. El procesamiento al que se sometió este lote es idéntico al de los demás y se describirá más adelante.

En el resto de las botellas el medio de incubación con colesterol radiactivo fue reemplazado por medio MEM fresco con suero fetal y en aquellas pertenecientes al lote etanol (E) se adicionó etanol a una concentración final de 400 mM. Al cabo de 24 horas a 37 °C este medio fue reemplazado por medio IMEM Zo adicionándose etanol (400 mM) en aquellas pertenecientes al lote (E). Las células se incubaron en estas condiciones durante 24 horas al cabo de las cuales, fueron removidas como se describió previamente y transferidas a tubos de vidrio para ser procesadas junto a las del lote "Control de Incorporación".

Después de tomar alícuotas para la determinación de proteína celular total (ver "Materiales y Métodos"), la suspensión celular de cada uno de los lotes se centrifugó a baja velocidad (500 rpm) obteniéndose un pellet de células sobre el cual se realizó una saponificación y extracción de lípidos insaponificables con éter de petróleo. El extracto etéreo se evaporó a seco, se resuspendió en 1 ml de cloroformo tomándose de allí alícuotas para conteo de radiactividad en contador de centelleo líquido.

Como puede observarse en la Figura IV.10, después de 24 horas de incubación en medio sin suero conteniendo colesterol ^3H se encontró una cantidad apreciable de marca en las células del lote Control de Incorporación (948635 ± 111433 DPM/cultivo). Luego de las 48 horas de tratamiento en el lote control se eliminó aproximadamente el 58 % de la marca incorporada, mientras que este valor fue significativamente mayor en los cultivos tratados con etanol 400 mM (71,4 %).

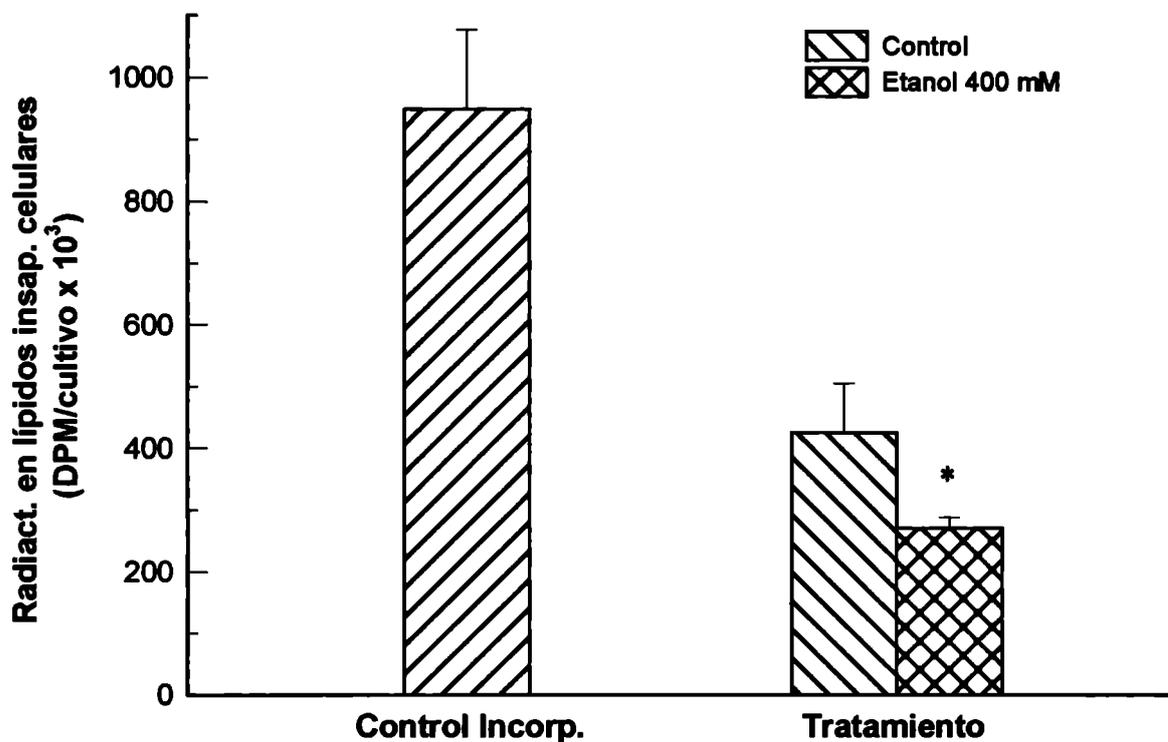
FIGURA IV.9.

RADIATIVIDAD EXPORTADA AL MEDIO CONDICIONADO EN ÁCIDOS GRASOS Y COLESTEROL EN CULTIVO DE CÉLULAS HEP G2. EFECTO DEL ETANOL.

Utilizando los datos presentados en las Tablas IV.3 y IV.4 fue calculado el porcentaje exportado planteando el cociente: radiactividad encontrada en medio condicionado / radiactividad total incorporada (marca detectada en la célula + marca detectada en el medio condicionado). Los datos representan el promedio \pm 1 SD de tres determinaciones.

(*) $p < 0,01$

FIGURA IV.10.

**ELIMINACIÓN DE COLESTEROL DE CÉLULAS HEP G2 AL MEDIO
CONDICIONADO. EFECTO DEL ETANOL.**

Las células se incubaron 48 horas en medio MEM con 10 % de suero fetal y luego durante 24 horas en medio sin suero más el agregado de colesterol ³H. Procediéndose a cosechar el lote "Control de Incorporación" y a someter al resto al tratamiento que se detalla en el ítem IV.D.2. Al finalizar el tratamiento se extrajeron los lípidos insaponificables de las células para realizar el conteo de radiactividad. Los datos representan el promedio \pm 1 SD de tres determinaciones. (*) $p < 0,02$

IV.E. ENSAYO DE INTEGRIDAD CELULAR CON TIMIDINA TRITIADA.

Este experimento se diseñó para estimar la pérdida de células durante las últimas 48 horas de cultivo y para determinar si esta pérdida se modifica por el tratamiento al que son sometidas las células del lote “etanol” a los efectos de descartar que variaciones de origen metodológico sean las responsables de los resultados hallados en los experimentos realizados.

Se sembraron $2,5 \times 10^6$ células en botellas de 95 cm^2 de superficie de pegado y se incubó en 15 ml de medio MEM con 10 % de suero fetal con la adición de $10 \mu\text{Ci}$ de ^3H -Timidina por botella durante 72 horas. Cumplido este lapso de tiempo, se removió el medio de incubación cuidadosamente. En este punto se apartó un lote suplementario denominado “Control de Incorporación”. Las células de las botellas de este lote fueron lavadas con solución fisiológica (tres veces) y se removieron con espátula de goma. Las células se transfirieron a tubos de vidrio para ser procesadas de la manera que se detallará más adelante.

Las células de las botellas pertenecientes a los otros lotes fueron lavadas con buffer fosfato estéril (pH: 7) tres veces. Luego se agregó a las botellas medio MEM fresco con suero fetal (10 %) y al lote etanol se le adicionó etanol absoluto a concentración final 400 mM. Las células permanecieron a 37°C en estas condiciones durante 24 horas. Luego se removió el medio de incubación y se reemplazó por otro sin suero (IMEM Zo) y en el caso de las botellas pertenecientes al lote etanol, éste fue suplementado con etanol a concentración idéntica a la antes mencionada. Las células fueron incubadas otras 24 horas a 37°C , posteriormente se eliminó el medio y se las lavó con solución fisiológica tres veces. Las células fueron removidas con espátula de goma y transferidas a tubos de vidrio para ser procesadas.

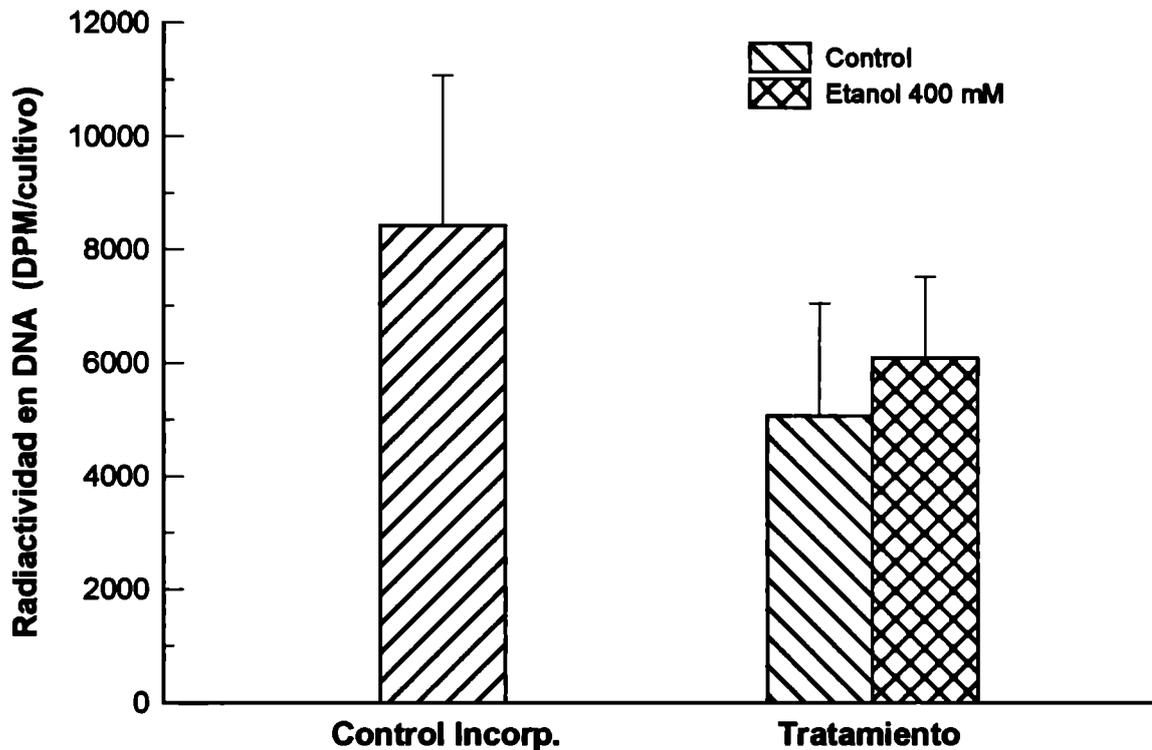
El procesamiento al que fueron sometidas comprendió la extracción del DNA por precipitación según se describe en el ítem II.B2.e de “Materiales y Métodos” y

se procedió a determinar la radiactividad incorporada en el ADN (ver ítem II.B.2.f.3).

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Figura IV.11. Después de 72 horas en presencia de ^3H -Timidina la radiactividad detectada en el lote control de incorporación es de 8416 ± 1327 dpm/cultivo (media \pm SD, n=3). Puede observarse que los cultivos del lote "Control" perdieron durante las últimas 48 horas de tratamiento el 40 % de la marca incorporada y que este porcentaje no se alteró significativamente por el agregado de etanol.

FIGURA IV.11.

ENSAYO DE INTEGRIDAD CELULAR CON TIMIDINA TRITIADA.



Las células sembradas se incubaron durante 72 horas en MEM con 10 % de suero fetal más el agregado de timidina ^3H . Cumplido este tiempo, las células del lote Control de Incorporación fueron cosechadas y el resto de las botellas fueron sometidas a tratamiento durante 48 horas. Al finalizar el experimento, el ADN celular total se extrae por precipitación con ácido tricloracético frío y se cuenta la radiactividad presente en él. Los datos representan el promedio ± 1 SD de tres determinaciones.

IV.F. DISCUSIÓN.

La utilización de modelos de células tumorales hepáticas en cultivos es imprescindible para el emprendimiento de estudios de regulación del crecimiento y metabolismo lipídico hepático. Si bien estos modelos pueden presentar algunas diferencias comparados con los cultivos primarios no replicativos de hepatocitos normales, estos últimos tienen otras desventajas, como la difícil obtención de fragmentos en buenas condiciones metabólicas, amplias diferencias individuales y corto tiempo de vida lo cual impide estudios de regulación a largo plazo.

IV.F.1. ELECCIÓN DE LAS HEP G2 EN CULTIVO COMO MODELO.

La línea tumoral Hep G2 es un hepatoblastoma humano que conserva muchas de las características bioquímicas de las células del parénquima hepático (147, 211, 212).

Las Hep G2 mantienen funciones especializadas de hepatocitos normales, incluyendo síntesis de apolipoproteínas y secreción y catabolismo de lipoproteínas (148). Fueron utilizadas con éxito en el estudio del rol regulatorio de lípidos (213 - 215) y hormonas (216) en la síntesis y secreción de apolipoproteínas y lipoproteínas, y para el estudio de la remoción de varias clases de lipoproteínas mediadas por receptor (217 - 220).

La actividad de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2, al igual que en células hepáticas normales puede ser regulada a diferentes niveles. Por un lado, inhibidores competitivos de la reductasa pertenecientes a la familia de los “statins” son activos sobre esta línea celular disminuyendo la síntesis de colesterol (191) y ocasionando una inducción de la cantidad total de enzima (201). Por otra parte, los resultados presentados en la Tabla IV.1 muestran que la presencia de suero fetal (que contiene LDL) en el medio de cultivo inhibe la actividad de la reductasa efecto que se ha reportado en células hepáticas normales en cultivo (71). Esta

inhibición de la actividad enzimática parece deberse a una disminución de la cantidad de enzima presente en las células dado que la afinidad por DL-hidroximetilglutaril CoA (medida a través de los valores de Km registrados) no se encuentra modificada (Figura IV.1), y sería el resultado de la inhibición feedback por esteroides derivados de la degradación de las LDL absorbidas desde el medio. De modo que, el mecanismo de regulación feedback por esteroides, que opera a nivel de la transcripción del gen de reductasa en células normales como fue descrito en el Capítulo I, parece estar conservado en estas células neoplásicas. Finalmente, se sabe que la administración de ácido mevalónico a animales inhibe la actividad HMG-CoA reductasa (221) y este efecto inhibitorio también fue reportado en células Hep G2 (194, 222). En la Tabla IV.2 puede verse que la adición de mevalonato 0,5 mM al medio de cultivo inhibe 2,6 veces la actividad HMG-CoA reductasa cuando las células Hep G2 son incubadas en medio sin suero. Esto indicaría que la elevada disponibilidad de mevalonato permite producir esteroides en cantidades suficientes como para inhibir la reductasa por el tradicional mecanismo feedback que opera en la mayoría de las células normales. El hecho de que la adición de mevalonato 0,5 mM al medio con suero, puede inhibir adicionalmente la actividad HMG-CoA reductasa que se halla parcialmente disminuida por la presencia de LDL llevándola a valores próximos a los correspondientes al blanco de reactivos (~ 4 pmoles/min) permite sugerir que, al igual que en diversas células normales en cultivo, en Hep G2 opera un complejo mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa en el cual se hallan involucrados esteroides y no-esteroides derivados del mevalonato (ver Capítulo I).

Por lo expuesto es posible considerar a las células Hep G2 en cultivo como un modelo útil y fidedigno para evaluar el efecto del etanol sobre la actividad HMG-CoA reductasa y la síntesis, eliminación y homeostasis del colesterol a nivel hepático. El origen humano de estas células representa una notable ventaja sobre cualquier otro modelo de células en cultivo.

IV.F.2. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA DE CÉLULAS HEP G2. RELACIÓN ENTRE COLESTEROGÉNESIS Y CRECIMIENTO CELULAR.

Para poner la concentración de etanol usada en los experimentos de esta tesis dentro de una perspectiva, 400 mM es equivalente a 1840 mg/dl mientras que el límite legal de alcohol en sangre para conducir en los países desarrollados es de 80 mg/dl. Niveles de alcoholemia de 300 mg/dl en humanos puede causar estupor y concentraciones del orden de los 400 mg/dl puede resultar en una falla respiratoria y algunas veces ocasionar la muerte. No obstante, dado que la concentración de etanol en la circulación portal después de la ingesta de alcohol puede ser mucho mayor que la encontrada en la periferia, es posible que los hepatocitos estén expuestos a concentraciones de etanol similares a las usadas en estos experimentos, luego de la ingesta aguda de etanol.

Como ya se mencionó, aproximadamente el 90 % del etanol absorbido es eliminado del organismo por oxidación a nivel hepático.

El principal camino metabólico del etanol en el hígado es su oxidación por la alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH), que cataliza la conversión de etanol en acetaldehído. Los equivalentes reductores de esta transformación se incorporan en moléculas de NAD^+ . El alcohol puede también ser oxidado a acetaldehído por un sistema accesorio que requiere NADP^+ y está localizado en el retículo endoplásmico (223). Este sistema se llama sistema microsomal oxidante de etanol (MEOS). Se sabe que el consumo crónico de alcohol incrementa la actividad del MEOS y ocasiona un desarrollo del retículo endoplásmico liso hepático (224).

El acetaldehído producido por cualquiera de los dos caminos metabólicos descritos puede ser reoxidado a través de una acetaldehído deshidrogenasa que se encuentra principalmente en mitocondrias (225). El resultado de esta oxidación es acetato, y es el principal metabolito de la oxidación del etanol encontrado en venas

suprahepáticas (226). En experimentos llevados a cabo utilizando etanol radiactivo fue observada la incorporación de radiactividad en una variedad de metabolitos que se sintetizan a partir de acetyl-CoA (ácidos grasos, colesterol, etc.), aunque no se sabe si el acetyl-CoA es producido directamente desde el acetaldehído o bien a partir del acetato (227).

El consumo crónico de etanol causa un daño hepático progresivo que puede ser lo suficientemente severo para provocar la muerte celular. El daño y la muerte celular dan lugar a una respuesta inflamatoria con infiltración de linfocitos y activación del sistema inmune, situación conocida como hepatitis, que si no se trata provoca la formación de tejido fibroso, desarrollándose la cirrosis cuando se reduce marcadamente la cantidad de hígado funcional (210).

La incubación de células Hep G2 en presencia de etanol (400 mM) ocasiona una disminución de la cantidad de proteína celular total (Figuras IV.3 y IV.6) que puede ser interpretado como una disminución del crecimiento celular dado que, el tratamiento no parece alterar la integridad de las células (Figura IV.11), las cuales conservan una elevada viabilidad (>90 %) y la capacidad de reanudar el crecimiento cuando el etanol es eliminado del medio (Figura IV.7). El hecho de que el etanol ocasiona una disminución del crecimiento fue reportado previamente por Polokoff y col. (228) quienes encontraron que la exposición a etanol de cultivos creciendo logarítmicamente de células de hepatoma bien diferenciado Reuber H35 (originario de rata) durante 72 horas, disminuye la velocidad de crecimiento de una manera concentración dependiente, llegando a ser cero cuando la concentración de etanol fue de 240 mM conservando las células una elevada viabilidad. Los mecanismos relacionados al efecto supresivo del crecimiento de la exposición aguda a etanol sobre células hepáticas fueron investigados por Higgins y col. usando células tumorales de hígado de rata 32IIIA. Ellos encontraron una disminución de la densidad de población, un incremento del tiempo de duplicación y demostraron que la inhibición de la proliferación observada en estas células

durante la exposición aguda a etanol *in vitro* es debida a una acumulación de las células en la fase G1 (229). Los efectos del etanol parecen ser inducidos por productos del metabolismo del etanol ya que efectos idénticos sobre el crecimiento celular fueron observados en células cultivadas en medios conteniendo acetaldehído (0,1 mM) y son inhibidos por la adición simultánea de pirazole, un inhibidor de la alcohol deshidrogenasa (230).

En células Hep G2 el etanol ocasiona una disminución de la actividad HMG-CoA reductasa que puede observarse aún utilizando concentraciones de etanol con las cuales la cantidad de proteína celular total no presenta modificaciones significativas (Figura IV.6). Estos cambios en la actividad reductasa no pueden ser atribuidos a efectos regulatorios del colesterol ya que el contenido del mismo en células y medio no se halla modificado (Tabla IV.3). Como se mencionó en el Capítulo I, una profunda inhibición de la reductasa en células en cultivo puede bloquear el crecimiento celular ocasionando una acumulación de las células en fase G1 y por lo tanto la inhibición de la reductasa por el etanol podría ser la causa de la disminución del crecimiento registrada. Sin embargo, dado que la adición de mevalonato (producto de la reacción catalizada por la reductasa) al medio condicionado no logra revertir la inhibición del crecimiento de las Hep G2 ocasionada por el etanol (Figura IV.8), la baja actividad reductasa registrada parece ser la consecuencia de una demanda de mevalonato disminuida resultante de la menor proliferación de las células.

Cuando el medio con etanol es eliminado y reemplazado por medio fresco conteniendo suero las células salen de la aparente fase lag, en la que se encontraban por efecto del tratamiento, proliferando activamente durante las primeras 12 horas y alcanzan al cabo de 24 horas una fase estacionaria de crecimiento en la cual la cantidad de proteína celular permanece aproximadamente constante (Figura IV.7). Paralelamente se observa que, aún cuando el medio de cultivo contiene suero fetal y por lo tanto existe colesterol exógeno disponible, la actividad HMG-CoA

reductasa se incrementa notablemente durante el período de tiempo en el cual las células proliferan activamente. Esto estaría indicando que el mevalonato endógeno producido en estas condiciones está siendo destinado fundamentalmente a la generación de productos finales distintos del colesterol requeridos para la proliferación celular. Mientras que, cuando las células llegan a la fase estacionaria de crecimiento la actividad de la reductasa cae abruptamente.

Estos resultados demuestran que la actividad de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2 varía en relación directa con la velocidad de proliferación celular y se adapta a las necesidades cambiantes de mevalonato, requerido para la síntesis endógena de colesterol y de isoprenoides no esteroides.

IV.F.3. EFECTO DEL ETANOL SOBRE HOMEOSTASIS DEL COLESTEROL EN CÉLULAS HEP G2.

El etanol es un factor conocido por alterar la homeostasis de los lípidos, siendo el disturbio más común la acumulación de lípidos en el citoplasma hepático (hígado graso) que está comúnmente asociado a hiperlipemia (231 - 234).

En seres humanos con hígado normal, el hígado graso se desarrolla cuando el etanol es administrado como un suplemento de la dieta normal o sustituyendo isocalóricamente a los hidratos de carbono (232 - 234). Estos hígados grasos son evidenciados por la morfología y el contenido lipídico de biopsias hepáticas que revelan un aumento de los triacilglicéridos de hasta 25 veces. La acumulación lipídica se hace visible en unos pocos días (234) y hasta en un sólo día según Wiebe y col. (235). Aunque el aumento es más dramático para los triacilglicéridos coexisten con él aumentos de fosfolípidos y ésteres de colesterol hepático (232, 236). En los experimentos presentados en esta tesis y realizados con células tumorales hepáticas humanas Hep G2 en cultivo, se encontró que la adición de etanol 400 mM no alteró el aspecto microscópico celular como puede observarse en

la Figura IV.4. Tampoco fue significativamente alterado por el tratamiento con etanol durante 48 horas, el contenido de colesterol celular total (Tabla IV.3). Este último resultado está de acuerdo con lo reportado por Polokoff y col. (228) quienes encontraron que, en células tumorales hepáticas bien diferenciadas H35 (originarias de rata), el tratamiento con etanol no modifica el contenido de colesterol total aunque sí pudieron observar un incremento del colesterol esterificado. Si bien la presencia de etanol ocasionó una disminución de la incorporación de acetato ^{14}C en colesterol y ácidos grasos celulares (Tablas IV.4 y IV.5), este resultado no puede interpretarse como indicativo de una disminución de la síntesis de estos lípidos. Dado que, "in vitro", una extensa fracción del esqueleto carbonado del etanol es incorporado en lípidos (237), la baja incorporación de acetato exógeno podría ser el resultado del efecto dilutorio del acetato formado en exceso a partir del etanol.

Los reportes de los efectos del etanol sobre los lípidos plasmáticos son más variables que los encontrados para hígado. Aparentemente esto se debe a diferencias en las dosis administradas, la dieta, la predisposición genética a la hiperlipemia y la duración del tratamiento (238). Experimentos realizados en voluntarios humanos y en animales de experimentación indican que la exposición prolongada al etanol es el principal factor en el desarrollo de la hiperlipemia (239). Los lípidos de la hiperlipemia alcohólica se encuentran principalmente en forma de VLDL y LDL (240). La administración de ácido orótico, un agente bloqueante de la liberación hepática de VLDL exclusivamente, evita la hiperlipemia post-alcohólica (241) en ratas, sugiriendo la posibilidad de que un incremento de la secreción de VLDL sean responsables primarios de la hiperlipemia post-alcohólica. Este tipo de hiperlipoproteinemia se clasifica como tipo IV (242). Además de la hipertrigliceridemia, generalmente se observan aumentos de colesterol y fosfolípidos séricos con aumento de LDL y HDL. En los experimentos realizados en el presente trabajo se observó que como resultado del tratamiento de las células

Hep G2 con etanol 400 mM se produce un aumento de la eliminación de colesterol previamente incorporado desde el medio condicionado (Figura IV.10) y un incremento de la cantidad relativa de marca exportada tanto en colesterol como en ácidos grasos (Figura IV.9) sin que se registren modificaciones significativas en el contenido de colesterol de células y medio (Tabla IV.3). Dado que el incremento en la exportación es cuatro veces mayor para ácidos grasos que para colesterol (Figura IV.9) y teniendo en cuenta que las VLDL son las únicas lipoproteínas sintetizadas por el hígado que contienen una proporción mayor de ácidos grasos que de colesterol (243), estos resultados parecen indicar que el etanol ocasiona un incremento en la exportación del colesterol al medio condicionado bajo la forma de colesterol-VLDL sin alcanzar en el tiempo de tratamiento una acumulación detectable por los métodos analíticos utilizados. Esto coincidiría con el incremento de la secreción de apolipoproteína B (la principal apolipoproteína de las VLDL) ocasionado por el etanol en estas mismas células reportado por Wang y col. (244).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A continuación se resumen las principales conclusiones obtenidas de este trabajo:

- 1 ➤ La HMG-CoA reductasa microsomal del HLMC y de hígado de ratones “nude” tienen propiedades cinéticas similares pese a pertenecer a tejidos distintos de especies diferentes.
- 2 ➤ La actividad HMG-CoA reductasa hepática de ratones “nude” se halla notablemente incrementada durante la medianoche, lo cual indicaría que en estos animales, al igual que en otros roedores, la enzima hepática presenta variaciones circadianas de la actividad con un pico máximo en la mitad de la fase oscura. Este aumento de la actividad parece deberse a un incremento de la cantidad de enzima ocasionado, al menos en parte, por la disminución del contenido de colesterol hepático que podría ser la consecuencia del patrón cambiante de llegada de colesterol dietario al hígado.
- 3 ➤ En el HLMC desarrollado en ratones “nude”, la actividad HMG-CoA reductasa y el contenido de colesterol mantienen un valor aproximadamente constante, independiente de la hora de sacrificio del animal. De modo que, este tumor no presentaría cambios cíclicos en los niveles de actividad de la HMG-CoA reductasa y exhibiría una velocidad de síntesis y contenido de colesterol aparentemente no modificados por la ingesta de alimentos, siendo éstas características comunes con la mayoría de los tejidos extrahepáticos.

- 4 > El HLMC ocasiona una alteración de la biosíntesis y homeostasis del colesterol en los ratones "nude" portadores del mismo. La hipocolesterolemia y la disminución del contenido de colesterol hepático en el animal huésped podría deberse a un aumento del catabolismo del colesterol a nivel hepático o a una elevada captación de LDL por el HLMC. El aumento de la actividad HMG-CoA reductasa registrada en hígado de ratones "nude" portadores del tumor, sería la consecuencia directa de la disminución del contenido de colesterol tisular y estaría indicando que la presencia del tumor induce un incremento de la síntesis de colesterol a nivel hepático.
- 5 > La administración crónica de Simvastatin (50 mg/kg/día durante 33 días) a ratones "nude" ocasiona, al igual que en ratas y ratones no mutantes, un notable incremento de la cantidad de HMG-CoA reductasa hepática sin que exista una modificación significativa de la colesterolemia. Esto indicaría que en estos animales, la inhibición de la HMG-CoA reductasa y por lo tanto la disminución de la velocidad de síntesis de colesterol ocasionada por esta droga tiende a compensarse con un incremento de la cantidad de enzima más que por un aumento de la captación de LDL plasmática.
- 6 > En ratones "nude" portadores del HLMC, el incremento de la cantidad de HMG-CoA reductasa hepática ocasionada por la administración crónica de Simvastatin parece haber compensado el efecto inhibitorio de la droga, lo cual se traduce en un contenido de colesterol hepático no modificado. Mientras que, en animales no portadores el equilibrio entre inducción enzimática e inhibición por el Simvastatin no se habría alcanzado, resultando en una disminución del contenido de colesterol hepático. De modo que, la presencia del tumor parece atenuar el efecto de la droga sobre el hígado de los ratones "nude".

- 7 ➤ El Simvastatin administrado crónicamente a ratones “nude” portadores del HLMC ocasiona un incremento de la actividad HMG-CoA reductasa tumoral sin modificar el contenido de colesterol del mismo. Esto, tomado conjuntamente con lo de los dos puntos anteriores, parece indicar que la restauración del equilibrio en la síntesis y homeostasis del colesterol, alcanzada merced a la inducción de la reductasa hepática y tumoral, sería la causa por la cual el Simvastatin no ocasiona una disminución del crecimiento del HLMC desarrollado en ratones “nude”.
- 8 ➤ El complejo mecanismo de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa que opera en células hepáticas normales y en el cual se hallan involucrados esteroides y no-esteroides derivados del mevalonato parece estar conservado en células Hep G2. De modo que, esta estirpe celular podrían considerarse como un modelo biológico interesante para evaluar el efecto de distintos factores sobre la actividad HMG-CoA reductasa y la homeostasis del colesterol a nivel hepático.
- 9 ➤ El etanol (400 mM) ocasiona una disminución tanto del crecimiento como de la actividad HMG-CoA reductasa de células Hep G2 sin que exista una modificación en el contenido de colesterol celular. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de que existe una estrecha correlación entre colesterogénesis y crecimiento celular.

- 10 > Cuando el etanol es removido del medio, las células Hep G2 recuperan su capacidad proliferativa y el incremento de la cantidad de proteína celular se acompaña con un notable aumento de la actividad HMG-CoA reductasa aún en presencia de colesterol en el medio de cultivo. Esto confirmaría que el mevalonato, además de ser requerido para la síntesis de colesterol, es incorporado en otros isoprenoides no esteroides que desempeñan funciones críticas en el crecimiento y proliferación celular.
- 11 > La disminución del crecimiento de células Hep G2 ocasionada por el etanol (400 mM) no puede ser revertida por el mevalonato. Entonces, la baja actividad HMG-CoA reductasa sería la consecuencia y no la causa de la disminución del crecimiento celular.
- 12 > El tratamiento con etanol (400 mM) no altera la integridad de las células Hep G2 ni incrementa la pérdida de células por desprendimiento de las mismas de la monocapa.
- 13 > El etanol (400 mM) produce un aumento en el porcentaje de eliminación al medio de cultivo de ácidos grasos y colesterol sintetizados a partir de acetato radiactivo y un incremento de la eliminación del colesterol radiactivo previamente incorporado por las células desde el medio de incubación. Esto, teniendo en cuenta lo mencionado en el punto anterior, permite sugerir que el etanol ocasiona un incremento de la exportación de colesterol desde las células Hep G2.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Spady, D.K., Turley, S.D. and Dietschy, J.M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **753**, 381-392.
- 2- Stange, E.F. and Dietschy, J.M. (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 703-713.
- 3- Turley, S.D. and Dietschy, J.M. (1988) The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. *In* The Liver: Biology and Pathobiology. 2nd ed. I.M. Arias, W.B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter, and D.A. Shafritz, editors. Raven, Press, Ltd., New York, NY. 617-641.
- 4- Björkhem, I. (1992) *J. Lipid Res.* **33**, 455-471.
- 5- Patsch, J.R. and Gotto Jr., A.M. (1987) *New Compr. Biochem.* **14**, 221-259.
- 6- Tall, A., Swenson, T., Hesler, C. and Granot, E. (1987) *New Compr. Biochem.* **14**, 277-297.
- 7- Havel, R.J. (1986) *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 119-134.
- 8- Dietschy, J.M. and Siperstein, M.D. (1967) *J. Lipid Res.* **8**, 97-104.
- 9- Jeske, D.J. and Dietschy, J.M. (1980) *J. Lipid Res.* **21**, 364-376.
- 10- Turley, S.D., Daggy, B.P. and Dietschy, J.M. (1991) *Metabolism.* **40**, 1063-1073.
- 11- Dietschy, J.M. (1968) *J. Clin. Invest.* **47**, 286-300.
- 12- Grundy, S.M., Ahrens, E.H. Jr. and Salen, G. (1971) *J. Lab. Clin. Med.* **78**, 94-121.
- 13- Dietschy, J.M., Turley, S.D. and Spady, D.K. (1993) *J. Lipid Res.* **34**, 1637-1659.
- 14- Yamada, N., Shames, D.M., Stoudemire, J.B. and Havel, R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 3479-3483.
- 15- Kita, T., Brown, M.S., Bilheimer, D.W. and Goldstein, J.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5693-5697.
- 16- Spady, D.K., Turley, S.D. and Dietschy, J.M. (1985) *J. Clin. Invest.* **76**, 1113-1122.

-
- 17- Spady, D.K., Huettinger, M., Bilheimer, D.W. and Dietschy, J.M. (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 32-41.
 - 18- Steinbrecher, U.P., Witztum, J.L., Kesäniemi, Y.A. and Elam, R.L. (1983) *J. Clin. Invest.* **71**, 960-964.
 - 19- Spady, D.K., Meddings, J.B. and Dietschy, J.M. (1986) *J. Clin. Invest.* **77**, 1474-1481.
 - 20- Daumerie, C.M., Woollett, L.A. and Dietschy, J.M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10797-10801.
 - 21- Andersen, J.M. and Dietschy, J.M. (1976) *Science.* **193**, 903-905.
 - 22- Ayté, J., Gil-Gómez, G., Haro, D., Marrero, P.F. and Hegart, F.G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3874-3878.
 - 23- Liscum, L., Cummings, R.D., Anderson, R.G.W., De Martino, G.N., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7165-7169.
 - 24- Brown, D.A. and Simoni, R.D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1674-1678.
 - 25- Faust, J.R., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6546-6548.
 - 26- Wilson, R.K. and Roe, B.A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 409-413.
 - 27- Faust, J.R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5018-5022.
 - 28- Shechter, Y., Klinger, E., Rucker, M.L., Engström, R.G., Spirito, J.A., Islam, M.A., Boettcher, B.R. and Weinstein, D.B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8628-8635.
 - 29- Chin, D.J., Gil, G., Russell, D.W., Liscum, L., Luskey, K.L., Basu, S.K., Okayama, H., Berg, P., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1984) *Nature* **308**, 613-617.
 - 30- Liscum, L., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Luskey, K.L., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 522-530.
 - 31- Luskey, K.L. and Stevens, B. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10271-10277.
 - 32- Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M. and Rine, J. (1988) *Molec. Cell Biol.* **8**, 3797-3808.

- 33- Gertler, F.B., Chiu, C.Y., Richter-Mann, L. and Chin, D.J. (1988) *Molec. Cell Biol.* **8**, 2713-2721.
- 34- Woodward, H.D., Allen, J.M.C. and Lennarz, W.J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18411-18418.
- 35- Rajkovic, A., Simonsen, J.N., Davis, R.E. and Rothman, F.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8217-8221.
- 36- Learned, R.M. and Fink, G.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2779-2783.
- 37- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1980) *J. Lipid Res.* **21**, 505-517.
- 38- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990) *Nature* **343**, 425-430.
- 39- Brown, M.S., Faust, J.R., Goldstein, J.L., Kaneko, I. and Endo, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1121-1128.
- 40- Nakanishi, M., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8929-8937.
- 41- Osborne, T.F., Gil, G., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3380-3387.
- 42- Panini, S.R., Schnitzer-Polokoff, R., Spencer, T.A. and Sinenski, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11044-11052.
- 43- Faust, J.R., Luskey, K.L., Chin, D.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5205-5209.
- 44- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1985) *Cell* **41**, 249-258.
- 45- Skalnik, D.G., Narita, H., Kent, C. and Simoni, R.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6836-6841.
- 46- Kandutsch, A.A., Chen, H.W. and Heiniger, H.-J. (1978) *Science* **201**, 498-501.
- 47- Krieger, M., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5052-5056.

-
- 48- Dawson, P.A., van der Westhuyzen, D.R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9046-9052.
- 49- Taylor, F.R., Saucier, S.E., Shown, E.P., Parish, E.J. and Kandutsch, A.A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12382-12387.
- 50- Leonard, S. and Sinensky, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 101-112.
- 51- Metherall, J.E., Goldstein, J.L., Luskey, K.L. and Brown, M.S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15634-15641.
- 52- Chang, T-Y. and Chang, C.C.Y. (1982) *Biochemistry* **21**, 5316-5323.
- 53- Beg, Z.H., Stonik, J.A. and Brewer, Jr., H.B. (1987) *Metabolism*. **36**, 900-917.
- 54- Kennelly, P.J. and Rodwell, V.W. (1985) *J. Lipid Res.* **26**, 903-914.
- 55- Endo, A., Kuroda, M. and Tsujita, Y. (1976) *J. Antibiot.* **29**, 1346-1348.
- 56- Brown, A.G., Smale, T.C., King, T.J., Hasenkam, P. and Thompson, R.H. (1976) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1165-1170.
- 57- Endo, A. (1979) *J. Antibiot.* **32**, 852-854.
- 58- Endo, A. (1980) *J. Antibiot.* **33**, 334-336.
- 59- Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, J., Joshua, H., Harris, E., Pachett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapeley, E., Albers-Schonberg, G., Hensen, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. and Springer, J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3957-3961.
- 60- Tsujita, Y., Kuroda, M., Shimada, Y., Tanzawa, K., Arai, M., Kaneko, Y., Tanaka, M., Masuda, H., Tarumi, C., Watanabe, Y. and Fuji, S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **877**, 50-60.
- 61- Lee, T.-J. (1987) *TIPS* **8**, 442-446.
- 62- Endo, A., Kuroda, M. and Tanazawa, K. (1976) *FEBS Lett.* **72**, 323-326.
- 63- Hoeg, J.M. and Brewer, H.B. (1987) *J. Am. Med. Assoc.* **258**, 3532-3536.

-
- 64- Yamamoto, A., Sudo, H. and Endo, A. (1980) *Atherosclerosis* **35**, 259-266.
- 65- Tolbert, J.A., Bell, G.D., Birtwell, J., James, Y., Kukovetz, W.R., Pryor, J.S., Buntinx, A., Holmes, I.B., Choa, Y.-S. and Bolognese, J.A. (1982) *J. Clin. Invest.* **69**, 913-919.
- 66- Havel, R.J., Hunninghake, D.B., Illingworth, D.R., Lees, R.S., Stein, E.A., Tolbert, J.A., Bacon, S.R., Bolognese, J.A., Frost, P.H., Lamkin, G.E., Lees, A.M., Leon, A.S., Gardner, K., Johnson, G., Mellies, M.J., Rhymer, P.A. and Tun, P. (1987) *Ann. Intern. Med.* **107**, 609-615.
- 67- The Lovastatin Study Group II (1986) *J. Med. Assoc.* **256**, 2829-2834.
- 68- Illingworth, D.R. and Sexton, G.J. (1984) *J. Clin. Invest.* **74**, 1972-1978.
- 69- Spady, D.K., Bilheimer, D.W. and Dietschy, J.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3499-3503.
- 70- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1986) *Science* **232**, 34-47.
- 71- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 897-930.
- 72- Runquist, M., Ericsson, J., Thelin, A., Chojnacki, T. and Dallner, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **267**, 5804-5809.
- 73- Ericsson, J., Appelkvist, E.L., Thelin, A., Chojnacki, T. and Dallner, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18707-18714.
- 74- Ericsson, J., Thelin, A., Chojnacki, T. and Dallner, G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19730-19735.
- 75- Adair, W.L. Jr. and Keller, R.K. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8990-8996.
- 76- Chojnacki, T. and Dallner, G. (1988) *Biochem. J.* **251**, 1-9.
- 77- Ekström, T.J., Chojnacki, T. and Dallner, G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4090-4097.
- 78- Appelkvist, E.L. and Kalén, A. (1989) *Eur. J. Biochem.* **185**, 503-509.
- 79- Kalén, A., Norling, B., Appelkvist, E.L. and Dallner, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **926**, 70-78.

-
- 80- Åberg, F., Appelkvist, E.L., Dallner, G. and Ernster, L. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 230-234.
- 81- Frei, B., Kim, M. and Ames, B.N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4879-4883.
- 82- Teclebrhan, H., Olsson, J., Swiezewska, E. and Dallner, G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23081-23086.
- 83- Kalén, A., Appelkvist, E.L., Chojnacki, T. and Dallner, G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1158-1164.
- 84- Epstein, W.W., Lever, D., Leining, L.M., Bruenger, E. and Rilling, H.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9668-9670.
- 85- Joly, A., Popják, G. and Edwards, P.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13495-13498.
- 86- Maltese, W.A. (1990) *FASEB. J.* **4**, 3319-3328.
- 87- Joly, A. and Edwards, P.A. (1991) *Curr. Opin. Lipid* **2**, 283-287.
- 88- Sinensky, M. and Lutz, R.J. (1992) *Bioessays* **14**, 25-31.
- 89- Barbacid, M. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-828.
- 90- Mulcahy, L.S., Smith, M.R. and Stacey, D.W. (1985) *Nature* **313**, 241-243.
- 91- Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1985) *Cell* **42**, 841-848.
- 92- Pawson, T., Amiel, T., Hinze, E., Auersperg, N., Neave, N., Sobelewski, A. and Weeks, G. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 33-39.
- 93- Papageorge, A.G., Willumsen, B.M., Johnsen, M., Kung, H.-F., Stacey, D.W., Vass, W.C. and Lowy, D.R. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1843-1846.
- 94- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. and Marshall, C.J. (1989) *J. Cell* **57**, 1167-1177.
- 95- Schafer, W.R., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S.-H. and Rine, J. (1989) *Science* **245**, 379-385.

-
- 96- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. and Chang, E.H. (1982) *Nature* **300**, 143-149.
- 97- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M. (1982) *Nature* **300**, 149-152.
- 98- Gibbs, J.B. and Marshall, M.S. (1989) *Micro. Rev.* **53**, 171-185.
- 99- Jackson, J.H., Cochrane, C.G., Bourne, J.R., Solski, P.A., Buss, J.E. and Der, C.J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3042-3046.
- 100- Sinensky, M., Beck, L.A., Leonard, S. and Evans, R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19937-19941.
- 101- Buss, J.E., Quilliam, L.A., Kato, K., Casey, P.J., Solski, P.A., Wong, G., Clark, R., McCormick, F., Bokoch, G.M. and Der, C.J. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 1523-1530.
- 102- Cox, A.D., Hisaka, M.M., Buss, J.E. and Der, C.J. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 2606-2615.
- 103- Kato, K., Cox, A.D., Hisaka, M.M., Graham, S.M., Buss, J.E. and Der, C.J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6403-6407.
- 104- Farnsworth, C.C., Wolda, S.L., Gelb, M.H. and Glomset, J.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20422-20429.
- 105- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T. and Shimonishi, Y. (1990) *Nature* **346**, 658-660.
- 106- Anant, J.S., Ong, O.C., Xie, H.Y., Clarke, S., O'Brien, P.J. and Fung, B.K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 687-690.
- 107- Qin, N., Pittler, S.J. and Baehr, W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8458-8463.
- 108- Repko, E.M. and Maltese, W.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9945-9952.
- 109- Leonard, S., Beck, L. and Sinensky, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5157-5160.
- 110- Srere, P.A., Chaikoff, I.L. and Dauben, W.C. (1948) *J. Biol. Chem.* **176**, 829-833.
- 111- Kandutsch, A.A. and Saucier, S.E. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **135**, 201-208.

-
- 112- Srere, P.A., Chaikoff, I.L., Treitman, S.S. and Burstein, L.S. (1950) *J. Biol. Chem.* **182**, 629-634.
- 113- Hellstrom, K.H. and Siperstein, M.D. (1973) *J. Clin. Invest.* **52**, 1303-1313.
- 114- Siperstein, M.D. and Fagan, V.M. (1964) *Cancer Res.* **24**, 1108-1115.
- 115- Chen, H.W., Heninger, H.J. and Kandustsch, A.A. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1950-1954.
- 116- Huneus, V.Q., Wiley, M.H. and Siperstein, M.D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5056-5060.
- 117- Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A. and Ross, R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 5134-5140.
- 118- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 5153-5162.
- 119- Witte, L.D., Cornicelli, J.A., Miller, R.W. and Goodman, D.S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 5392-5401.
- 120- Chen, H.W., Kandutsch, A.A. and Waymouth, C. (1974) *Nature* **251**, 419-421.
- 121- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7306-7314.
- 122- Goldstein, J.L. Helgeson, J.A.S. and Brown, M.S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5403-5409.
- 123- Kaneko, I., Hazama-Shimada, Y. and Endo, A. (1978) *Eur. J. Biochem.* **87**, 313-321.
- 124- Kandutsch, A.A. and Chen, H.W. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 409-415.
- 125- Cornell, R., Grove, G.L., Rothblat, G.H. and Horwitz, A.F. (1977) *Exp. Cell Res.* **109**, 299-307.
- 126- Larson, R.A., Chung, J., Scanu, A.M. and Yachnin, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3028-3032.
- 127- Fairbanks, K.P., Witte, L.D. and Goodman, D.S. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1546-1551.
- 128- Maltese, W.A. and Sheridan, K.M. (1987) *J. Cell Physiol.* **133**, 471-481.

-
- 129- Langan, T.J. and Volpe, J.J. (1987) *J. Neurochem.* **49**, 513-521.
- 130- Doyle, J.W. and Kandustch, A.A. (1988) *J. Cell Physiol.* **137**, 133-140.
- 131- Sinensky, M. and Logel, J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3257-3261.
- 132- Quesney-Huneus, V., Wiley, M.H. and Siperstein, M.D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 378-385.
- 133- Maltese, W.A., Aprille, J.R. and Green, R.A. (1987) *Biochem. J.* **246**, 441-447.
- 134- Flagan, S.P. (1966) *Genet. Res. (Camb.)* **8**, 295-309.
- 135- Pantelouris, E.M. (1968) *Nature* **217**, 370-371.
- 136- Rygaard, J. (1969) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 761-762.
- 137- Manning, D.D., Reed, N.D. and Shaffer, C.F. (1973) *J. Exp. Med.* **138**, 448-494.
- 138- Rygaard, J. and Polvsen, C.O. (1969) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 758-760.
- 139- de Antueno R.J., Niedfeld G., De Tomás M.E., Mercuri O.F. and Quintans C. (1987) *Biochem. Int.* **14**, 1097-1103.
- 140- Houchens, D.P., Ovejera, A.A. and Barker, A.D. (1978) In: "The Use of Atimic Nude Mice in Cancer Research (Houchens, D.P., and Ovejera, A.A., eds.), pp. 267-289, G. Fischer, Stuttgart.
- 141- Sebti, S.M., Tkalcevic, G.T. and Jani, J.P. (1991) *Cancer Comm.* **3**, 141-147.
- 142- Al-Shubaji, A., Larson-Backstrom, C., Berglund, L., Eggertsen, G., and Björkhem, I. (1991) *Lipids* **26**, 385-389.
- 143- Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M. and Tanzawa, K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **575**, 266-276.
- 144- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- 145- Martin, G.R. and Evans, M.J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1441-1444.

-
- 146- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B. (1979) *Nature* **282**, 615-616.
- 147- Knowles, B.B., Howe, C.C. and Aden, D.P. (1980) *Science* **209**, 497-499.
- 148- Thrift, R.N., Forte, T.M., Cahoon, B.E. and Shore, V.G. (1986) *J. Lipid Res.* **27**, 236-250.
- 149- Wanson, J.C., Drochmans, P., Mosselmans, R. and Ronveaux, M-F. (1977) *J. Cell. Biol.* **74**, 858-877.
- 150- Richter, A., Sanford, K.K. and Evans, V.J. (1972) *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1705-1710.
- 151- Phillips, H.J. (1973) *In: "Dye exclusion test for cell viability in tissue cultures"*. Academic Press., New York. Pág. 406.
- 152- Wanson, J.C. (1976) *In: "Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies"*. (De. Tager J.M., Soling H.D., Williamson J.R.). Amer. Els. Publ. Comp., New York. Pág. 185.
- 153- Weigand, K. (1976) *In: "Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies"*. (De. Tager J.M., Soling H.D., Williamson J.R.). Amer. Els. Publ. Comp., New York. Pág. 185.
- 154- Jauregui, H.O., Hayner, N.T., Driscoll, J.L., Williams-Holland, R., Lipsky, M.H. and Galletti, P.M. (1981) *In Vitro* **17**, 1100-1104.
- 155- Saucier, S.E. and Kandutsch, A.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 541-556.
- 156- Cavenee, W.K., Chen, H.W. and Kanutsch, A.A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2675-2681.
- 157- Patterson, M.K. Jr. (1979) *In: "Methods in Enzimology"*. (De. Jacoby, W.B. and Pastan, I.H.) Academic Press, New York. Vol. 58, pág. 144.
- 158- Sambrook, J. and Maniatis (1989) *In: "Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- 159- Cooper, T.G. (1984) *In: "Instrumentos y técnicas en Bioquímica"*. (De. Reverté) Cap. III, pág. 103.

-
- 160- Shapiro D.J., Nordstrom J.L., Mitschelen J.J., Rodwell V.W. and Schimke R.T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **370**, 369-377.
- 161- Brown M., Goldstein J. and Dietschy J. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5144-5149.
- 162- Farquhar, J.W., Insull, W., Rosen, P., Stoffel, W. and Ahrens, R.H. (1959) *Nutr. Rev.* **17**, 29-31.
- 163- Shapiro, D.J. and Rodwell, V.W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 867-872.
- 164- Kandutsch, A.A. and Saucier, S.E. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 2299-2305.
- 165- Hamprecht, B., Nüssler, C. and Lynen, F. (1969) *FEBS Lett.* **4**, 117-121.
- 166- Siperstein, M.D. (1970) *Curr. Top. Cell. Regul.* **2**, 65-110.
- 167- Dietschy, J.M. and Brown, M.S. (1974) *J. Lipid Res.* **15**, 508-516.
- 168- Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L. and Mitschelen, J.J. (1976) *Adv. Lipid Res.* **14**, 1-74.
- 169- Shapiro, D.J. and Rodwell, V.W. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 3210-3216.
- 170- Rodwell, V.W., McNamara, D.J. and Shapiro, D.J. (1973) *Adv. Enzimol.* **38**, 373-412.
- 171- Edwards, P.A. and Gould, R.G. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1520-1524.
- 172- Higgins, M.J.P. and Rudney, H. (1973) *Nature New Biol.* **246**, 60-61.
- 173- Higgins, M.J.P., Brady, D. and Rudney, H. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 271-282.
- 174- Fukuda, H., Katsurada, A. and Iritani, N. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **835**, 163-168.
- 175- Skalnik, D.G., Narita, H., Kent, C. and Simoni, R.D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13311-13315.
- 176- Subba Rao, G. and Ramasarma, T. (1971) *Environ. Physiol.* **1**, 188-197.
- 177- Chao, F.C., Efron, B. and Wolf, P. (1975) *Cancer* **35**, 1223-1229.

-
- 178- Vitols, S., Gahrton, G., Björkholm, M. and Peterson, C. (1985) *Lancet* **2**, 1150-1154.
- 179- Budd, D. and Ginsberg, H. (1986) *Cancer* **58**, 1361-1365.
- 180- Alexopoulos, C.G., Blatsios, B. and Avgerinos, A. (1987) *Cancer* **60**, 3065-3070.
- 181- Henriksson, P., Eriksson, M., Ericsson, S., Rudling, M., Stege, R., Berglund, L. and Angelin, B. (1989) *Lancet* **ii**, 1178-1180.
- 182- Kruth, H.S., Avigan, J., Gamble, W. and Vaughan (1979) *J. Cell. Biol.* **83**, 588-594.
- 183- Gal, D., Ottashi, M., MacDonald, P.C., Buschbaum, H.J. and Simpson, E.R. (1981) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **139**, 877-885.
- 184- Rudling, M.J., Reihner, E., Einarsson, K., Ewerth, S. and Angelin, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 3469-3473.
- 185- Rudling, M.J., Angelin, B., Peterson, C.O. and Collins, V.P. (1990) *Cancer Res.* **50**, 483-487.
- 186- de Bravo, M.G., Tournier, H., Schinella, G., Viaggi, M. and Quintans, C. (1995) *Medicina* **55**, 670-674.
- 187- Shiroeda, O., Yamaguchi, N. and Kawai, K. (1987) *Cancer Res.* **47**, 4630-4633.
- 188- Chen, H.W., Kandutsch, A.A. and Heiniger, H.J. (1978) *Prog. Exp. Tumor Res.* **22**, 275-316.
- 189- Vitols, S. (1991) *Cancer Cells* **3**, 488-495.
- 190- Buchwald, H. (1992) *The Lancet* **339**, 1154-1156.
- 191- Cohen, L.H., Griffioen, M., Havekes, L., Schouten, D., Hinsbergh, V.V. and Kempen, H.J. (1984) *Biochem. J.* **222**, 35-39.
- 192- Liscum, L., Luskey, K.L., Chin, D.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8450-8455.
- 193- Singer, I.I., Kawka, D.W., Kazazis, D.M., Alberts, A.W., Chen, J.S., Huff, J.W. and Ness, G.C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5556-5560.

- 194- Boogaard, A., Griffioen, M. and Cohen, L.H. (1987) *Biochem. J.* **241**, 345-351.
- 195- Tanaka, R.D., Edwards, P.A., Lan, S.F., Knöppel, E.M. and Fogelman, A.M. (1982) *J. Lipid Res.* **23**, 1026-1031.
- 196- Endo, A. (1985) *J. Medic. Chem.* **28**, 401-405.
- 197- Hasumi, K., Yamada, A., Shimizu and Endo, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 547-552.
- 198- Panini, S.R., Sexton, R.C. and Rudney, H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7767-7771.
- 199- Clarke, C.F., Fogelman, A.M. and Edwards, P.A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14363-14367.
- 200- Ma, P.T.S., Gil, G., Südhof, T.C., Bilheimer, D.W., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8370-8374.
- 201- Qin, W., Infante, J., Wang, S. and Infante, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1127**, 57-66.
- 202- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 1450-1461.
- 203- Marshall, C.J., (1993) *Science (Washington DC)* **259**, 1865-1866.
- 204- Endo A., Tsujita Y., Kuroda M. and Tanzawa K. (1977) *Eur. J. Biochem.* **77**, 31-36.
- 205- Stone, B.G., Evans, C.D., Prigge, W.F., Duane, W.C. and Gebhard, R.L. (1989) *J. Lipid Res.* **30**, 1943-1952.
- 206- Maltese, W.A., Defendini, R., Green, R.A., Sheridan, K.M. and Donley, D.K. (1985) *J. Clin. Invest.* **76**, 1748-1754.
- 207- Soma, M.R., Baetta, R., De Renzis, M.R., Mazzini, G., Davegna, C., Magrassi, L., Butti, G., Pezzotta, S., Paoletti, R. and Fumagalli, R. (1995) *Cancer Res.* **55**, 597-602.
- 208- Duggan, D.E., Chen, I.W. and Bayne, W.F. (1989) *Drug. Met. Dispos.* **17**, 166-173.
- 209- Lieber, C.S. (1973) *N. Engl. J. Med.* **288**, 356-362.
- 210- Lieber, C.S. (1978) *N. Engl. J. Med.* **298**, 888-893.

-
- 211- Schwartz, A.L., Fridovich, S.E., Knowles, B.B. and Lodish, H.F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8878-8881.
- 212- Morris, K.M., Goldberger, G., Colten, H.R., Aden, D.P. and Knowles, B.B. (1982) *Science* **215**, 399-400.
- 213- Wang, S.R., Pessah, M., Infante, J., Catala, D., Salvat, C. and Infante, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **961**, 351-363.
- 214- Rash, J.M., Rothblat, G.H. and Sparks, C.E. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 294-298.
- 215- Dashti, N. and Wolfbauer, G. (1987) *J. Lipid Res.* **28**, 423-436.
- 216- Tam, S.P., Archer, T.K. and Deeley, R.G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1670-1676.
- 217- Havekes, L., Van Hinsbergh, V., Kempen, H.J. and Emeis, J. (1983) *Biochem. J.* **214**, 951-958.
- 218- Dashti, N., Wolfbauer, G., Koren, E., Knowles, B. and Alaupovic, P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 373-384.
- 219- Dashti, N., Wolfbauer, G. and Alaupovic, P. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **833**, 100-110.
- 220- Illingworth, D.R., Lindsey, S. and Hagermenas, F.C. (1984) *Exp. Cell Res.* **155**, 518-526.
- 221- Edwards, P.A., Popjak, G., Fogelman, A.M. and Edmond, J. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 1057-1063.
- 222- Erickson, S.K. and Fielding, P.E. (1986) *J. Lipid Res.* **27**, 875-883.
- 223- Lieber, C.S. and De Carli, L.M. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 2505-2512.
- 224- Rubin, E., Hutterer, F. and Lieber, C.S. (1968) *Science* **159**, 1469-1470.
- 225- Tottmar, S.O.C., Petterson, H. and Kiessling, K.H. (1973) *Biochem. J.* **135**, 577-586.
- 226- Lundquist, E., Tygstrup, N., Winkler, K., Mellengaard, K. and Munch-Petersen, S. (1962) *J. Clin. Invest.* **41**, 955-961.

-
- 227- Kats, J. and Chaikoff, I.L. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 87-101.
- 228- Polokoff, M.A., Iwahashi, M. and Simon, F.R. (1983) *J. Lipid Res.* **24**, 1030-1038.
- 229- Higgins, P.J. and Borenfreud, E. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3857-3862.
- 230- Higgins, P.J. and Borenfreud, E. (1986) *Digestion* **34**, 161-168.
- 231- Mallov, S. and Bloch, J.L. (1956) *Am. J. Physiol.* **184**, 29-34.
- 232- Lieber, C.S., Jones, D.P. and De Carli, L.M. (1965) *J. Clin. Invest.* **44**, 1009-1021.
- 233- Lieber, C.S. and Rubin, E. (1968) *Am. J. Med.* **44**, 200-207.
- 234- Rubin, E. and Lieber, C.S. (1968) *N. Engl. J. Med.* **278**, 869-876.
- 235- Wiebe, A., Lundquist, A. and Belfrage, P. (1971) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **27**, 33-36.
- 236- De Carli, L.M. and Lieber, C.S. (1967) *J. Nutr.* **91**, 331-336.
- 237- Sheig, R. (1971) *Gastroenterology* **60**, 751-755.
- 238- Crouse, J.R. and Grundy, S.M. (1984) *J. Lipid Res.* **25**, 486-490.
- 239- Lieber, C.S., Jones, D.P., Mendelson, J. and De Carli L.M. (1963) *Trans. Ass. Am. Physicians* **76**, 289-301.
- 240- Avogaro, P. and Cazzolato, G. (1975) *Metabolism* **24**, 1231-1242.
- 241- Hernell, O. and Johnson, O. (1973) *Lipids* **8**, 503-508.
- 242- Beaumont, J.L., Carlson, L.A., Cooper, G.R., Fejfar, Z., Fredrikson, D.S. and Strasser, T. (1970) *Bull WHO* **43**, 891-915.
- 243- Thompson, G.R. (1982) *In: "Biochemical Aspects of Human Disease. Ed: Elkeles, R. Oxford, England. Pag. 85.*
- 244- Wang, T.W.M., Byrne, C.D. and Hales, C.N. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1211**, 234-238.