

Metabolismo lipídico en ratones atímicos portadores y no portadores de un tumor de pulmón humano derivado de células A549

Bellini, M. J.; Polo, M. P.; Bravo, M.G. de*

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). UNLP-CONICET
Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP
Calle 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina

RESUMEN: A fin de evaluar la influencia de un tumor derivado de células A549 desarrollado en ratones atímicos sobre el metabolismo lipídico del huésped se determinó el contenido de colesterol y la composición de ácidos grasos de fosfolípidos plasmáticos, hepáticos y tumorales. Se estudió la actividad de las enzimas desaturantes en microsomas hepáticos y la incorporación y metabolización de mevalonato en distintos tejidos. Se utilizaron animales no portadores y portadores de tumor. La presencia del tumor parece disminuir la captación de las LDL plasmáticas y la catabolización del colesterol en el hígado. La metabolización del mevalonato se encuentra afectada en todos los tejidos estudiados. El tumor inhibiría la síntesis de esteroides a partir de mevalonato y la actividad $\Delta 5$ desaturasa del hígado huésped. Estos datos deben tenerse en cuenta al utilizar este modelo para realizar estudios sobre la relación entre crecimiento tumoral y distintas drogas que afectan dicho metabolismo.

Palabras claves: A549 – ratones atímicos – metabolismo lipídico – mevalonato

SUMMARY: Lipid metabolism in athymic mice with or without an implanted human carcinoma derived from a549 cells. Bellini, M. J., Polo, M. P. y Bravo, M.G. de. In order to evaluate the influence of a tumor derived from A549 cells developed in athymic mice on the lipid metabolism of the host we analyzed the cholesterol content and the fatty acid composition of plasmatic, hepatic and tumor phospholipids. The activity of the desaturase enzymes was studied in hepatic microsomes and the uptake and metabolization of mevalonate in different tissues. The presence of the tumor seems to diminish the uptake of plasmatic LDL and the catabolization of cholesterol in the liver. The mevalonate metabolism was affected in all the studied tissues. The tumor would inhibit the synthesis of sterols from mevalonate and the activity $\Delta 5$ hepatic desaturase. These data must be taken into account when using this model to study the relationship between tumor growth and the various drugs that alter this metabolism

KEY WORDS: A549 – athymic mice – lipid metabolism – mevalonate.

Correspondencia:

Dra. Margarita García de Bravo.
INIBIOLP. Facultad de Cs. Médicas, Calles 60 y 120.
(1900) La Plata. Tel.: 0221-4236967
FAX: 0221-4258988
e-mail: mgarcia@atlas.med.unlp.edu.ar

Introducción

Los ratones congénitamente atímico son un modelo útil para el estudio de sistemas inmune y se usan como receptores de trasplantes de tejidos alogénicos y xenogénicos (1). El trasplante de tumores humanos a ratones atímicos nu/nu se reportó por primera vez en 1969 (2). Estudios posteriores han demostrado la utilidad de este modelo experimental en la investigación contra el cáncer, ya que se preservan muchas características morfológicas, biológicas y bioquímicas de los tumores (3-5).

Muchos laboratorios han reportado efectos producidos en el animal huésped causados por la implantación de tumores. En lo que respecta a los efectos sobre el metabolismo lipídico estos se encuentran principalmente a nivel hepático (6,7). En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos reportado cambios en la composición de ácidos grasos y la biosíntesis y homeostasis del colesterol cuando un tumor de pulmón humano (HLMC) fue desarrollado en estos ratones (8,9).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el modelo de tumor humano derivado de células A549 en ratones atímicos. Se estudiaron distintos aspectos del metabolismo del huésped y del tumor a fin de evaluar la utilidad de este modelo para realizar estudios sobre la relación entre crecimiento tumoral y distintas drogas que afectan dicho metabolismo.

Materiales y Métodos

Reactivos

Mevalonolactona, RS-[5-³H(N)] (24.00 Ci/mmol), Ácido α -linolénico, [1-¹⁴C] (53Ci/mol) y Ácido dihomo- δ -linolénico [1-¹⁴C] (52 Ci/mol) fueron adquiridos a la firma DuPont NEN (Boston, MA, USA). Los estándares utilizados fueron adquiridos a Sigma (St. Louis, MO, USA). Para cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas de silicagel G marca Merck (Alemania). El suero fetal bovino estéril se obtuvo de la empresa Gen S.A. Para la determinación de colesterol plasmático se utilizó un kit enzimático método CHOD-PAD de Boehringer Mannheim. Todos los reactivos inorgánicos y los solventes utilizados fueron de calidad pro análisis.

Animales

Se utilizaron ratones NIH hembras portadores del genotipo nu/nu. Se trata de ratones mutantes sin pelo, de condición atímica (ratones nude). 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 en 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.).

Los animales fueron alimentados "ad libitum" con una dieta estándar de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma (planta de irradiación IONICS, El Talar, Buenos Aires, Argentina). La composición se detalla en la Tabla 1. Se les permitió libre acceso al consumo de agua acidulada (pH: 3) esterilizada.

Células

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

Desarrollo y mantenimiento del tumor humano en ratones nude

Las células fueron resuspendidas en MEM + 10% SFB e implantadas en el espacio interescapular de los ratones (aprox. 2×10^6 cel/ratón). El tumor fue mantenido por repiques sucesivos, realizados cada dos meses. Para ello el tumor fue removido quirúrgicamente, se lavó con MEM más 10% de SFB y se eliminaron regiones necrosadas. 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. De acuerdo a lo observado por otros autores la inoculación subcutánea de A549 no produ-

jo metastasis (11) El tumor incrementó progresivamente su tamaño, llegando a alcanzar dimensiones considerables (mayores a los 4 g). El tiempo de duplicación en masa registrado en fase logarítmica de crecimiento es de 8-10 días.

Extracción y análisis de lípidos

Los lípidos totales de células, tumor, plasma y tejidos fueron extraídos empleando el método de Folch y col (12). Las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos fueron separadas por cromatografía en micro-columna con sílica (13). Los lípidos insaponificables y los ácidos grasos totales se obtuvieron con KOH 10% en etanol y extracción en medio alcalino seguida de extracción en medio ácido con éter de petróleo (14). Los ácidos grasos libres provenientes de la saponificación de lípidos totales o de la fracción de fosfolípidos fueron metilados (15). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) fueron analizados en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama, sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific), comparando sus tiempos de retención con los de una mezcla de estándares conocidos. La distribución de la radiactividad entre los EMAG fue analizada en un radio cromatógrafo Varian Star 3400 CX en tándem con un detector gaseoso (GC-Ram; Inus System Inc. Tampa, FL), utilizando una columna de vidrio rellena con "SP-2330" al 10% (p/p) en Chomosorb WAW-DMCS de 100-200 mallas (Supelco Inc., Bellefonte, PA). Los EMAG fueron identificados comparando sus tiempos de retención relativos con los de una mezcla de estándares conocidos, mientras que la distribución de la radiactividad fue calculada electrónicamente por cuantificación del área de los picos. El colesterol libre y colesterol esterificado se separaron por TLC, usando como solvente de corrida hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1), se visualizaron por el método de cloruro férrico de Lowry (16) y se cuantificaron por densidad utilizando un Software de análisis de imágenes unidimensional (Kodak, Rochester, NY) para exposiciones múltiples, comparando con curvas construidas utilizando estándares comerciales (1-10 µg). El contenido de fósforo proveniente de la extracción de lípidos totales o de fosfolípidos se cuantificó por el método de Chen y col. (17), construyendo una curva de calibración con estándares comerciales.

Incorporación de [³H]-mevalonolactona en tejidos

Los animales portadores y no portadores de tumor fueron inyectados i.p. con 15 µCi del material radiactivo cada 8 hs durante 24 hs. Los animales se sacrificaron, se extrajo sangre y se removieron quirúrgicamente hígado, riñón, corazón y pulmón de animales no portadores y portadores, además del tumor en estos últimos. Del plasma se obtuvieron los lípidos insaponificables y los ácidos grasos libres, cuantificándose la radiactividad incorporada en ellos. Los distintos tejidos extraídos se homogeneizaron y se separaron fracciones acuosa, proteica y lipídica según la técnica descrita por Maltese y Sheridan (18) determinándose luego la radiactividad incorporada. Para ello se adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) frío durante 30 min. en hielo. El material precipitado se centrifugó 20000 x g durante 20 min. y el sobrenadante acuoso se recogió en tubos de vidrio. El precipitado se lavó 2 veces con TCA 10% (p/v) frío, centrifugando a 20000 x g durante 20 min. después de cada lavado, todos los sobrenadantes acuosos fueron colectados en el mismo tubo, obteniéndose así lo que se denominó Fracción Acuosa. El pellet fue delipidizado mediante una extracción secuencial con acetona, cloroformo/metanol (2:1, v/v) y etanol fríos (19). El producto de la delipidización se denominó Fracción Lipídica. El material insoluble proveniente de la precipitación con TCA fue solubilizado con KOH 1 N a 60°C, en agitación y luego neutralizada con HCl 1N. La solución obtenida se corresponde con la denominada Fracción Proteica. De las fracciones lipídicas se obtuvieron los ácidos grasos libres y los lípidos insaponificables, determinándose la radiactividad incorporada. Los distintas especies presentes en el insaponificable de hígado y riñón fueron separadas por TLC en cloroformo 100% y se determinó la distribución relativa de la radiactividad en las mismas (20). Los lípidos insaponificables separados fueron (valor de RF entre paréntesis): colesterol (0,34), lanosterol (0,52), dolicol (0,60), ubiquinona (0,70) y escualeno (0,81).

Obtención de microsomas de hígado y tumor

Los tejidos fueron homogeneizados en sacarina 0,25 M, KCl 0,15 M, N-acetil cisteína 1,46 mM, MgCl₂ 5 mM, buffer fosfato (pH 7,4) 0,04 M, NaF 0,04 M. La fracción microsomal se obtuvo por

centrifugación diferencial (21) y se almacenó a -80°C . La concentración de proteína fue determinada de acuerdo al método de Lowry y col. (22).

Ensayo de actividad $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturante

Las actividades $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas fueron determinadas en microsomas hepáticos y tumorales utilizando como sustratos $[1-^{14}\text{C}]$ ácido dihomo- γ -linolénico (20:3 n-6) y $[1-^{14}\text{C}]$ ácido α -linolénico (18:3 n-3) respectivamente utilizando la técnica descrita por Garda y col. (23). Los ácidos grasos fueron derivatizados a sus respectivos ésteres metílicos y se analizó el porcentaje de conversión por radio GLC (24).

Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados experimentales se encuentran expresados como el promedio de al menos 3 determinaciones ± 1 desviación estándar (SD). Las hipótesis estadísticas se ensayaron mediante el test "t" de Student. 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 $a = 0,01$ (o menor), la decisión se la consideró altamente significativa. Para $a = 0,05$ se la consideró significativa y para valores de $a > 0,05$ 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.

Resultados

Como ya fuera descrito la línea celular A549 es capaz de generar tumores al ser inyectada en ratones atímicos (11,25). Los animales portadores de tumor no presentaron diferencias en la ingesta de alimentos ni agua respecto al lote no portador, tampoco presentaron variaciones de peso (datos no mostrados).

Contenido de colesterol

El contenido de colesterol hepático y tumoral fue determinado previa extracción de lípidos totales de cada tejido y saponificación de las muestras, de manera tal de cuantificar el colesterol total. Los re-

sultados (Tabla 2) muestran un aumento de la colesterolemia, sin observarse cambios en el contenido de colesterol hepático en animales portadores.

Composición de ácidos grasos de fosfolípidos

Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4. La presencia del tumor parece no afectar la composición de ácidos grasos de fosfolípidos tanto plasmáticos como hepáticos. Respecto a la composición de ácidos grasos de tumor, se puede observar un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados con un bajo porcentaje de polinsaturados.

Incorporación y metabolización de mevalonato radiactivo

Se evaluó la influencia de la presencia del tumor sobre la incorporación y metabolización de $[^3\text{H}]$ -mevalonato en distintos tejidos del animal huésped.

Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2, 3 y 4. Se observa que la presencia del tumor tiende a aumentar la incorporación total de mevalonato en todos los tejidos estudiados, haciéndose significativo el aumento en hígado, corazón y pulmón (Figura 1). El mayor porcentaje de radiactividad se encuentra en la fracción lipídica (Figura 2), además el tumor tiende a aumentar la incorporación total en esta fracción (Figura 3), este incremento parece ser a expensas de un aumento en la incorporación en ácidos grasos (Figura 3).

En la Figura 4 se observa que la mayor parte de la marca incorporada en lípidos insaponificables se encuentra en colesterol, habiendo una disminución en hígado y un aumento no significativo en riñón de animales portadores.

Actividad desaturante

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

No se pudo detectar actividad desaturante en los microsomas tumorales

Tabla 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
Componentes minoritarios	2,1

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

Tabla 2. Contenido de colesterol plasmático, hepático y tumoral

Tejido	Colesterol total	
	No portador	Portador
Plasma	0,80 ± 0,08	2,16 ± 0,81**
Hígado	1,13 ± 0,18	2,36 ± 0,80
Tumor	—	1,28 ± 0,36

Los valores de colesterolemia se expresan en g de colesterol total/l de plasma y los valores de colesterol tisular se expresan en mg de colesterol total/g tejido. Los datos representan la media ± DS de cuatro determinaciones.

(**) $p < 0,01$

Tabla 3. Distribución porcentual de ácidos grasos de fosfolípidos plasmáticos en animales no portadores y portadores de tumor

Ácido graso	No portador	Portador
16:0	31,4 ± 2,1	31,2 ± 2,0
17:0	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2
18:0	23,3 ± 4,1	23,5 ± 4,1
18:1 n-9	23,3 ± 4,1	23,5 ± 4,1
18:1 n-7	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
18:2 n-6	14,8 ± 2,9	15,1 ± 2,8
20:4 n-6	12,7 ± 2,6	12,8 ± 2,6
22:6 n-3	4,8 ± 1,8	4,3 ± 1,3
18:0/18:1	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3
18:2/20:4	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0
Sum. Saturados	55,7 ± 6,4	55,6 ± 6,4
Sum. n-6	27,5 ± 5,6	24,7 ± 12,7
Sum n-3	4,8 ± 1,8	4,3 ± 1,3
II	122,5 ± 23,7	120,4 ± 23,2

Sólo se consideraron los ácidos grasos principales.

II (Índice de insaturación) = Σ % de ácido graso x n° de dobles ligaduras del ácido graso.

Los resultados representan la media ± DS de 4 determinaciones independientes.

Tabla 4. Distribución porcentual de ácidos grasos de fosfolípidos hepáticos y tumorales

Acido graso	Hígado		Tumor	Células A549 en cultivo
	No portador	Portador		
14:0	-----	-----	1,3 ± 0,4	2,5 ± 0,6*
15:0	-----	-----	0,4 ± 0,1	-----
16:0	33,9 ± 6,9	29,0 ± 2,6	36,0 ± 2,0	24,5 ± 2,8***
16:1 n-7	-----	-----	6,5 ± 2,4	9,5 ± 1,9
17:0	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	-----
18:0	23,0 ± 2,9	19,6 ± 3,7	24,5 ± 2,4	19,1 ± 2,6*
18:1 n-9	7,3 ± 1,8	8,1 ± 3,3	21,1 ± 1,8	25,4 ± 3,0*
18:1 n-7	1,3 ± 0,4	1,9 ± 0,4	4,9 ± 1,1	5,6 ± 2,1
18:2 n-6	14,8 ± 2,6	14,2 ± 2,1	4,1 ± 2,0	2,3 ± 1,3
20:4 n-6	13,4 ± 6,5	17,0 ± 2,2	-----	5,3 ± 2,1
22:6 n-3	5,5 ± 3,4	6,6 ± 1,3	0,7 ± 0,3	3,1 ± 2,4**
16:0/16:1	-----	-----	5,7 ± 0,9	2,7 ± 0,5***
18:0/18:1	2,9 ± 1,1	2,2 ± 0,8	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,2
18:2/20:4	1,5 ± 1,0	1,0 ± 0,2	-----	0,5 ± 0,3
Sum. Saturados	57,7 ± 9,5	49,1 ± 5,0	37,6 ± 2,4	46,2 ± 4,4*
Sum. n-6	5,5 ± 3,4	6,6 ± 1,3	4,1 ± 2,0	9,6 ± 3,6*
Sum n-3	28,1 ± 6,4	34,2 ± 2,6	0,7 ± 0,3	3,1 ± 1,4**
II	124,6 ± 44,6	152,3 ± 15,7	35,6 ± 10,7	91,5 ± 15,1***

Sólo se consideraron los ácidos grasos principales.

II (Índice de insaturación) = Σ % de ácido graso x n° de dobles ligaduras del ácido graso.

Los resultados representan la media ± DS de 4 determinaciones independientes.

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

Tabla 5. Actividad de $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturante de microsomas hepáticos de ratones nude portadores y no portadores de tumor

Porcentaje de conversión de los ácidos grasos incubados.

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

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

Figura 1. Incorporación total de mevalonato en distintos tejidos de ratones nude no portadores y portadores. Se inyectaron i.p. 15 μ Ci [3 H]-Mevalonato en animales portadores y no portadores de tumor cada 8 horas durante 24 horas. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo sangre por punción cardiaca y se removieron hígado, riñón, corazón y pulmón, además del tumor de los animales portadores. La radiactividad total incorporada representa la suma de la incorporada en las fracciones proteica, lipídica y acuosa separadas (ver leyenda de la Figura 2). Los datos representan la media \pm DS de cuatro determinaciones. (*) $p < 0,05$

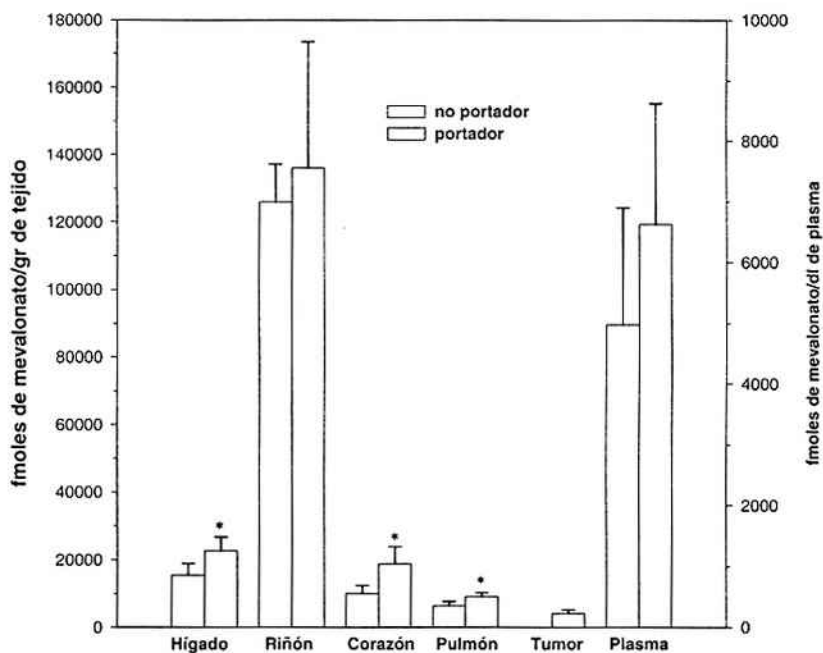


Figura 2. Distribución porcentual de mevalonato en fracciones de tejidos. Los tejidos se homogeneizaron y se separaron fracciones acuosa, proteica y lipídica, determinándose luego la radiactividad incorporada. Para ello se adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) frío durante 30 min. en hielo. Luego de centrifugado y precipitado se lavó dos veces con TCA y se recogieron los sobrenadantes acuosos, obteniéndose así lo que se denominó Fracción Acuosa. El pellet fue delipidizado con acetona, cloroformo/metanol (2:1, v/v) y etanol fríos. El producto de la delipidización se denominó Fracción Lipídica. El material insoluble proveniente de la precipitación con TCA fue solubilizado con KOH 1 N a 60°C, en agitación y luego neutralizado con HCl 1N. La solución obtenida se corresponde con la denominada Fracción Proteica. Los datos representan la media \pm DS de cuatro determinaciones, (*) $p < 0,01$

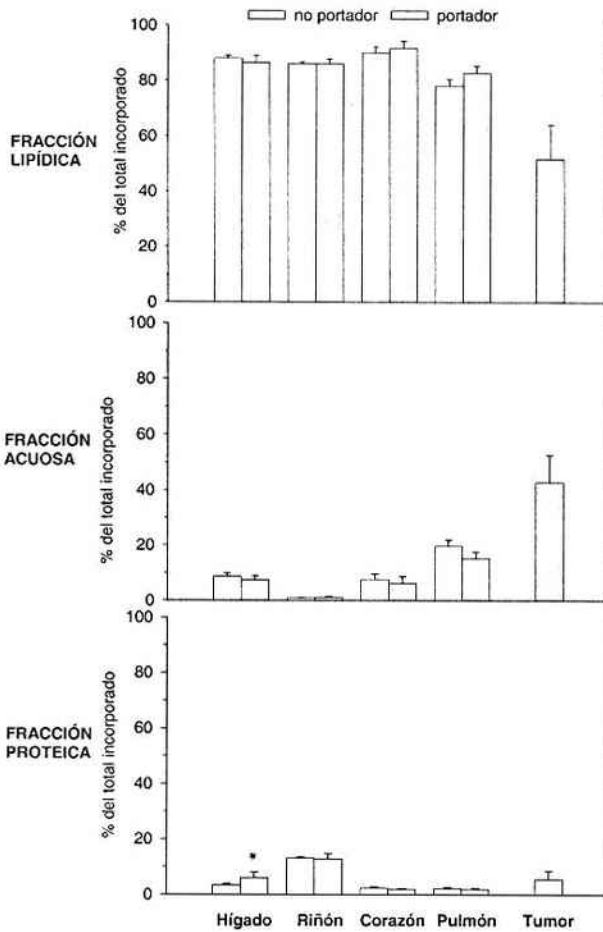


Figura 3. Incorporación de mevalonato en lípidos. De las fracciones lipídicas se obtuvieron los ácidos grasos libres y los lípidos insaponificables con KOH 10% en etanol y extracción en medio alcalino seguida de extracción en medio ácido con éter de petróleo, determinándose la radiactividad incorporada. Los datos representan la media \pm DS de cuatro determinaciones, (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$

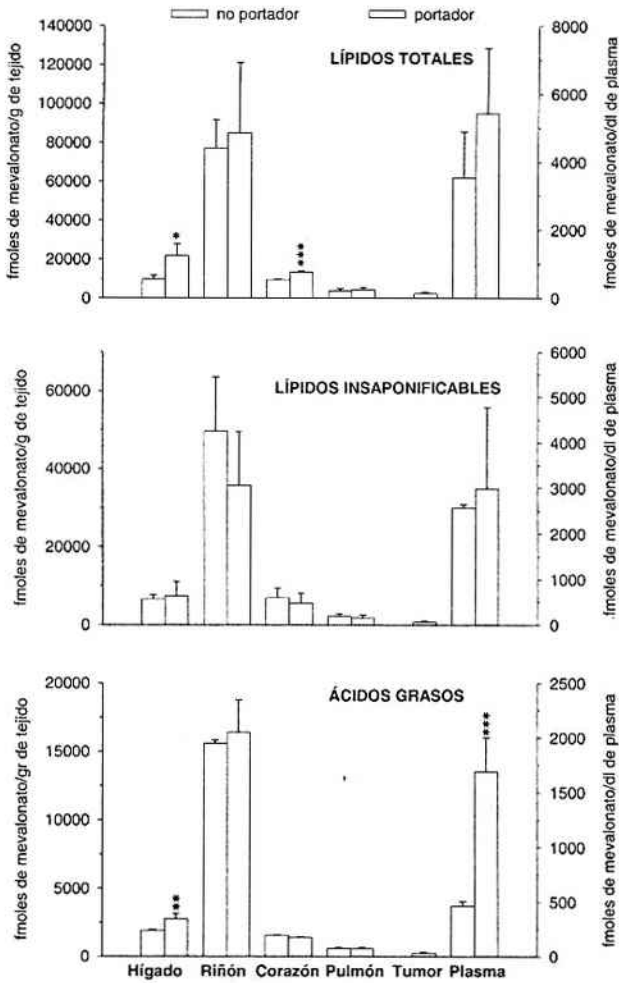
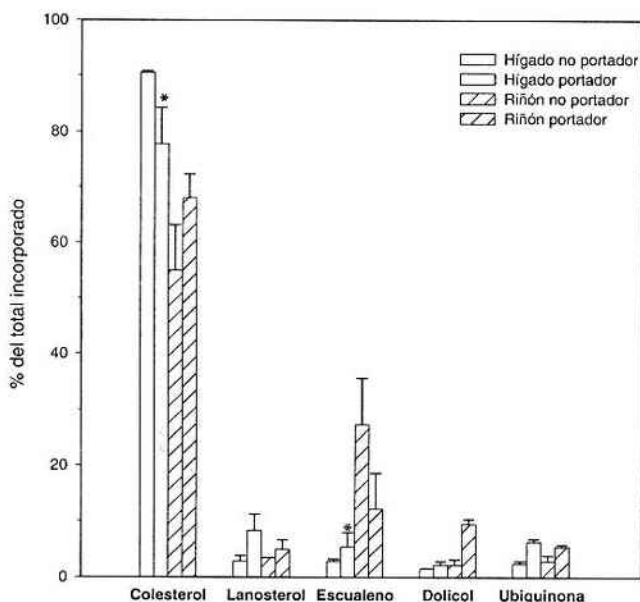


Figura 4. Distribución de mevalonato en lípidos insaponificables de hígado y riñón. Los distintas especies presentes en el insaponificable de hígado y riñón fueron separadas por TLC en cloroformo 100% y se determinó la distribución relativa de la radiactividad en las mismas. Los lípidos insaponificables separados fueron (valor de RF entre paréntesis): colesterol (0,34), lanosterol (0,52), dolicol (0,60), ubiquinona (0,70) y escualeno (0,81). Los datos representan la media \pm DS de cuatro determinaciones, (*) $p < 0,01$



Discusión

En nuestro laboratorio se estudió ampliamente un tumor desarrollado y mantenido durante más de 15 años en ratones atímicos, derivado de un tumor mucoepidermoide de pulmón humano (HLMC) (8,9). Comparado el contenido de colesterol del tumor actualmente en estudio con el del HLMC, se encontró que es significativamente menor ($1,28 \pm 0,36$ vs. $4,17 \pm 0,45$ mg de col/ gr de tejido).

Respecto a la composición de ácidos grasos de fosfolípidos tumorales, se encontró un elevado porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados y muy bajo de ácidos grasos polinsaturados, no habiéndose detectado ácido araquidónico. En este sentido el tumor derivado de A549 también muestra diferencias respecto del HLMC, el cual presentaba un 12%

de araquidónico y un 5% de 22:6 n-3 (26). También se encontraron diferencias respecto a la composición de ácidos grasos de fosfolípidos de la línea celular A549 en cultivo (tabla 4). En ésta el contenido de polinsaturados fue mayor, sobre todo de 20:4 n-6 (5,3 % en la línea celular vs ND en el tumor) y de 22:6 n-3 (3,1 % en la línea en cultivo vs 0,7 % en el tumor). Esto último refleja una diferenciación de las células al ser implantadas en el huésped. Las células en cultivo utilizan como fuente principal de ácidos grasos los provenientes del suero con el que se suplementa su medio de cultivo, debido a lo cual, la composición de AG celulares refleja la de dicho medio (27).

Metabolismo lipídico en ratones portadores de tumor.

Contenido de colesterol plasmático y hepático

La presencia del tumor aumenta la colesterolemia en el animal portador observándose una tendencia a aumentar el contenido de colesterol hepático, aunque la misma no resulta significativa. Estos datos se contraponen con los encontrados en ratones portadores del HLMC, en los cuales tanto la colesterolemia como el contenido de colesterol hepático se encontraban disminuidos (28). Esto lleva a pensar en diferentes efectos provocados por ambos tumores sobre el huésped que desencadenarían distintas respuestas en el animal portador. La tendencia a aumentar el contenido de colesterol hepático podría deberse a un aumento de la síntesis o a una disminución del catabolismo en hígado, ocasionado por el tumor. En ambos casos el colesterol hepático aumentaría, con la consecuente disminución de la captación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) plasmáticas y por lo tanto un aumento de la colesterolemia. Sumada a esta disminución de la captación de LDL, el aumento de colesterol hepático podría causar una disminución en la actividad reductasa (29). En el caso del HLMC, se demostró que este tumor ocasionaba un aumento de la actividad reductasa hepática (9).

Incorporación y metabolización de mevalonato exógeno por diferentes tejidos

El estudio de la incorporación, distribución y metabolización de mevalonato radiactivo por distintos tejidos permite conocer el requerimiento que tienen de los distintos productos derivados del mismo, así como también la influencia que tiene el tumor sobre la vía. Se encontró que el tumor tiende a aumentar la incorporación de mevalonato en todos los tejidos estudiados, fundamentalmente en la fracción lipídica.

Particularmente en el hígado, este aumento de la incorporación sería un indicador de que el tumor disminuiría la síntesis de mevalonato en este tejido. Esto ocasionaría una disminución en el pool de mevalonato hepático en animales portadores que se refleja en un aumento de la incorporación exógena. Este aumento tendería a compensar la disminución en la cantidad de mevalonato disponible para la síntesis de colesterol. Sin embargo el incremento en la incorporación de mevalonato en lípidos hepáticos se da a expensas de un aumento en ácidos grasos más

que en lípidos insaponificables, lo que hace suponer que no podría destinarlo a la síntesis de colesterol por una posible inhibición en la síntesis, más allá de mevalonato. Hecho que concuerda con el aumento encontrado en la incorporación en la fracción proteica.

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

Respecto a la gran incorporación encontrada en riñón, coincide con los resultados encontrados por otros autores (29-33). Aparentemente el riñón presenta un pool de mevalonato endógeno muy bajo, por lo cual la incorporación exógena se encontraría incrementada (34).

Actividad desaturante

Existe una estrecha relación entre la síntesis de colesterol y la biosíntesis de ácidos grasos (35, 36). Al estudiar las actividades desaturantes encontramos una disminución en la $\Delta 5$ desaturación de 20:3 n-6 (28%) en microsomas hepáticos de animales portadores de tumor respecto a animales no portadores, sin observarse cambios significativos en la actividad $\Delta 6$ desaturasa. En nuestro modelo experimental, la variación en la actividad $\Delta 5$ desaturasa no se refleja en la composición de ácidos grasos de fosfolípidos, lo cual también ha sido descrito anteriormente (26, 37). En cambio la falta de actividad $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturante en el tumor sí se refleja en su composición con bajísimo porcentaje de ácidos grasos polinsaturados.

Uno de los mecanismos posibles, sugeridos para explicar la actividad $\Delta 5$ desaturasa disminuida en animales portadores, se relaciona con el contenido de colesterol tisular aumentado. Este colesterol podría modificar las propiedades biofísicas del entorno lipídico microsomal que rodea a los sistemas desaturantes (38) modificando de esta manera las actividades de las desaturasas.

Conclusión

El modelo de tumor A549/ratón inmuno-deficiente nude presenta diferencias en la composición lipídica respecto a la línea celular de origen. La presencia del tumor afecta metabolismo lipídico del hígado del animal portador y la metabolización del mevalonato se encuentra afectada en todos los tejidos estudiados. Estos cambios deben ser tenidos en cuenta cuando se utilice este modelo en estudios sobre la relación entre crecimiento tumoral y distintas drogas que afectan dicho metabolismo.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y la asistencia técnica de la Sra. M. Prinzo.

Bibliografía

1. Rygaard J. "Thymus and self: immunobiology of the mouse mutant nude". 1973. John Wiley and Sons (London).
2. Rygaard, J. and Povlsen, C.O., 1969. Heterotransplantation of a human tumor to "nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77: 758-760.
3. Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K., Horohashi, S., Koike, T. and Hayashi, T., 1976. Transplantation of human tumors in nude mice *J Natl Cancer Inst* 56: 1251-1260.
4. Sharkey, F.E. and Fogh, J. 1984. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* 3(4): 341-60.
5. Carmichael, J. and Smyth, J.F. Chemotherapy studies in human non-small cell lung cancer xenografts transplanted in immune-deprived mice. In *Human tumour Xenografts in anticancer Drug Development*, eds B. Winograd, MJ Peckman and HM Plnedo), pp 51-55. Springer-Verlag, New York, 1988
6. Wood, R. and Wiegand, R.D. 1975. Hepatoma, host liver, and normal rat liver lipids: distribution of isomeric monoene fatty acids in individual lipid classes. *Lipids.* 10(12): 746-9.
7. Kitada, S., Mwasi, L., Mead, J.F. and Hays, E.F. 1978. Liver and thymus lipid composition in AKR mice with and without lymphomas. *Lipids* 13(7):464-7.
8. de Antueno, R.J., Niedfeld, G., De Tomas, M.E., Mercuri, O.F. and Quintans, C. 1987. Tumor lipids and liver lipid metabolism

in the model human lung carcinoma/nude mice. *Biochem Int.* 14(6):1097-103.

9. Polo, M., de Bravo, M.G. and Carbone, C., 1999. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in liver of athymic mice with or without an implanted human carcinoma. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 122(4):433-7.
10. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. and Knowles, B.B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 5739: 615-6.
11. Shindo-Okada N, Takeuchi K, Han BS, Nagamachi Y. 2002. Establishment of cell lines with high and low metastatic potential from A549 human lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 93, 1:50-60
12. Folch, J., Lees, M. and Stanley, S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-503.
13. Hanahan, D.J., Dittnar, J.C. and Warashima, E.A. 1957. A column chromatographic separation of classes of phospholipides. *J. Biol. Chem* 228: 685-700.
14. Haeffner, E.W., Hoffmann, C.J., Stoehr, M. and Scherf, H. 1984. Cholesterol-induced growth stimulation, cell aggregation, and membrane properties of ascites tumor cells in culture. *Cancer Res.* 44, 6: 2668-76.
15. Morrison, W.R. and Smith, L.M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride—methanol. *J Lipid Res.* 53: 600-8.
16. Lowry, R.R. 1968. Ferric chloride spray detector for cholesterol and cholesteryl esters on thin-layer chromatograms. *J Lipid Res.* 9, 3:397.
17. Chen, P.S., Toribara, T. and Warner, H. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28: 1756-58.
18. Maltese, W.A. and Sheridan, K.M. 1987. Isoprenylated proteins in cultured cells: subcellular distribution and changes related to altered morphology and growth arrest induced by mevalonate deprivation. *J Cell Physiol.* 133, 3:471-81.
19. Schmidt, R.A., Schneider, C.J. and Glomset, J.A. 1984. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J Biol Chem.* 259, 16: 10175-80.
20. Maltese, W.A. and Aprile, J.R. 1985. Relation of mevalonate synthesis to mitochondrial ubiquinone content and respiratory function in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 260, 21:11524-9.
21. Catalá, A., Nervi, A.M. and Brenner, R.R. 1975. Separation of a protein factor necessary for the oxidative desaturation of fatty acids in the rat. *J Biol Chem.* 250, 18:7481-4.

22. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 1: 265-75.
23. Garda, H.A., Leikin, A.I. and Brenner, R.R. 1992. Determination of fatty acid desaturase activities by RP-HPLC. *An. Asoc. Quim. Argent.* **80**, 4: 365-71.
24. Albino, L., Polo, M.P., Bravo, M.G. de and Alaniz, M.J.T. de. 2001. Uptake and metabolic conversion of saturated and unsaturated fatty acids in Hep2 human larynx tumor cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **65**, 5-6: 295-300.
25. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. and Todaro, G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer.* **17**, 1: 62-70.
26. Bravo, M. G. de, Schinella, G., Polo, M. and Tournier, H. 1996. Effects of lovastatin on the fatty acid desaturation in a human lung mucoepidermoid carcinoma grown in nude mice. *Biochem Mol Biol Int.* **38**, 5: 929-35.
27. Rosenthal, M.D. 1980. Selectivity in incorporation, utilization and retention of oleic and linoleic acids by human skin fibroblasts. *Lipids* **15**, 10: 838-48.
28. Polo, M. and Bravo, M.G. de. 2001. Simvastatin effects on a human lung carcinoma and cholesterol homeostasis of host and non host mice. *Arch. Physiol. Biochem.* **109**, 5: 435-40.
29. Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425-430.
30. Dietschy, J.M. and Siperstein, M.D. 1967. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J Lipid Res.* **2**: 97-104.
31. Righetti, M., Wiley, M.H., Murrill, P.A. and Siperstein, M.D. 1976. The in vitro metabolism of mevalonate by sterol and non-sterol pathways. *J Biol Chem.* **251**, 9: 2716-21.
32. Aguilera, J.A., Linares, A., Arce, V. and Garcia-Peregrin, E. 1983. Incorporation of mevalonate into squalene, lanosterol and cholesterol by different neonatal chick tissues. *Int J Biochem.* **15**, 12: 1481-4.
33. Linares, A., Aguilera, J.A., Arce, V. and Garcia-Peregrin, E. 1983. Studies of the in vivo metabolism of mevalonic acid in the neonatal chick. *Int J Biochem.* **15**, 12:1477-80.
34. Elmberger, P.G., Kalen, A., Appelkvist, E.L. and Dallner, G. 1987. In vitro and in vivo synthesis of dolichol and other main mevalonate products in various organs of the rat. *Eur J Biochem.* **168**, 1: 1-11.
35. Ridgway, N.D., Byers, D.M., Cook, H.W. and Storey M.K. 1999. Integration of phospholipid and sterol metabolism in mammalian cells. *Prog Lipid Res.* **38**, 4: 337-60.
36. Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* **109**, 9: 1125-31.
37. Georges, B., Blond, J.P., Maniongui, C. and Bezard, J. 1993. Effect of simvastatin on desaturase activities in liver from lean and obese Zucker rats. *Lipids* **28**, 1: 63-5.
38. Leikin, A.I., and Brenner, R.R. 1988. In vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. *Biochim Biophys Acta.* **963**, 2: 311-9.