



Scaglia, Natalia

Papel de la Esteroil-CoA Desaturasa en el fenotipo celular neoplásico



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Scaglia, N. (2005). *Papel de la Esteroil-CoA Desaturasa en el fenotipo celular neoplásico. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/138>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Papel de la Esteroil-CoA Desaturasa en el fenotipo celular neoplásico

TESIS DOCTORAL

Natalia Scaglia

nscaglia@gmail.com

Resumen

Los ácidos grasos son importantes fuentes de energía metabólica así como componentes esenciales de los fosfolípidos de membrana, de los lípidos de reserva y de diversas moléculas mensajeras. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son las especies de ácidos grasos más abundantes en los mamíferos y su contenido es regulado por la esteroil-CoA desaturasa (SCD), la enzima que cataliza la conversión de ácidos grasos saturados en sus correspondientes monoinsaturados. Se ha reportado una correlación positiva entre niveles altos de ácidos grasos monoinsaturados y la transformación neoplásica, pero se conoce poco acerca del papel de la SCD en la proliferación y apoptosis, así como en el desarrollo del cáncer.

En el presente trabajo reportamos que la disminución de la SCD mediante la transfección estable del cDNA de la SCD en posición antisentido en fibroblastos de pulmón humanos transformados con SV40 (células hSCDas) redujo la producción de ácidos grasos monoinsaturados, así como la síntesis *de novo* de ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío (células control). Las células hSCDas también mostraron un contenido elevado de ácidos grasos libres saturados y triacilglicéridos. Notablemente, las células con niveles reducidos de SCD mostraron una marcada reducción en la proliferación y supresión del crecimiento independiente de anclaje. La suplementación con ácido oleico exógeno (el principal ácido graso monoinsaturado de mamíferos) no revirtió la disminución en la proliferación ni la pérdida de la capacidad de crecimiento independiente de anclaje en las células hSCDas, lo que sugiere que la síntesis endógena de ácidos grasos monoinsaturados es esencial para la rápida proliferación e invasión, dos características distintivas de la transformación neoplásica. Adicionalmente, la apoptosis se incrementó en las células deficientes en SCD, independientemente del contenido de ceramidas, mensajeros lipídicos proapoptóticos sintetizados a partir del ácido graso saturado palmítico. Más aún, la disminución de SCD sensibilizó a las células a la apoptosis inducida por ácidos grasos saturados, en comparación con las células control. Finalmente, en células derivadas de carcinoma de pulmón humano A549, la deficiencia de SCD incrementó el periodo de latencia de xenografts y disminuyó el crecimiento de los tumores en ratones *nude*.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que, al regular globalmente el metabolismo lipídico, la esteroil-CoA desaturasa modula la proliferación y supervivencia celular y enfatiza el importante papel de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados para mantener el fenotipo neoplásico de las células

transformadas.

El presente trabajo de tesis, para optar por el grado de Doctor, Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Quilmes, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección del Dr. R. Ariel Igal y la codirección del Dr. Daniel F. Alonso.

Durante la realización del mismo recibí apoyo económico de la Fundación Antorchas y del CONICET y, mediante subsidios otorgados al Dr. R.A. Igal, de la Fundación Antorchas y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Parte del trabajo aquí presentado fue publicado en *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(27):25339-49.

Agradecimientos

a Ariel, por la dirección de mi tesis y mi formación como investigadora, por su creatividad y dedicación, por guiarme y darme asimismo la libertad de aprender de mis propias experiencias, por generar un ambiente de discusión en el que importan las razones y no los escalafones, por su confianza y comprensión, por apostar en mí.

al Dr. Daniel Alonso por la codirección de mi tesis y de mi beca doctoral.

A Ariel, Carolina, Matías y Débora por constituir un grupo de trabajo científicamente estimulante, solidario y cálido.

a Betina, Gisela y Lisandro por su apoyo constante.

a Woodi por poder contar con él siempre.

a Mauro, Margarita, Marisa y María José quienes me brindaron su experiencia para la obtención de algunos resultados aquí presentados.

a Silvio Igal, al Dr. C. Alberto Fossati y a la Dra. G.C de Cingolani.

a Picky, Mabel, al Dr. Brenner, Garda, Juan, Tati, Alejandra, Pollero, Cacho, Susana, Gabriela, Patricia, Luciana, Nicolás, Rosana, Elsa, Mónica Polo, Sabrina y Annie.

a Sobaba.

a mi mamá y mis hermanas.

Tabla de contenidos

Abreviaturas

Introducción

Estado actual del conocimiento

1. Síntesis de ácidos grasos y glicerolípidos: Generalidades
2. Esteroil-CoA Desaturasa
3. La proliferación celular y la síntesis de membranas
4. Muerte celular y lipotoxicidad
5. Mecanismos propuestos
6. Características de las células transformadas

Objetivos e hipótesis generales del trabajo

Modelos celulares

Materiales y Métodos

1. Materiales
2. Cultivo Celular
3. Construcción del vector de expresión pcDNA3-hSCDAs
4. Transfección y Selección clonal
5. Ensayos de marcación metabólica
6. Extracción de lípidos celulares
7. Saponificación y Esterificación de ácidos grasos
8. Cromatografía en capa fina
9. Cromatografía gas-líquida
10. Medición de proteínas
11. Electroforesis
12. Western blot
13. Northern blot
14. Análisis de apoptosis 1: Fragmentación del ADN
15. Análisis de apoptosis 2: Morfología nuclear
16. Análisis de apoptosis 3 Actividad de caspasa-3

17. Cuantificación de ceramidas: Ensayo de Diacilglicerol kinasa
18. Análisis de proliferación celular 1: Incorporación de [³H] timidina
19. Análisis de proliferación celular 2: Curva de crecimiento
20. Análisis del crecimiento celular independiente de anclaje
21. Mantenimiento de los animales
22. Análisis de tumorigenicidad
23. Análisis estadístico

Resultados

1. Subexpresión estable del gen de la Esteroil-CoA Desaturasa: Modelo celular SV40-WI 38
2. Los SFA exógenos son vehiculizados diferencialmente hacia los triacilglicéridos mientras que los MUFA se incorporan preferentemente en los fosfolípidos en las células deficientes en SCD
3. La síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol está disminuida en las células deficientes en SCD
4. La síntesis *de novo* de PL y TAG decrece en las células hSCDas
5. La masa de FFA y TAG se incrementa en las células hSCDas-A, principalmente gracias a un aumento en el contenido de SFA
6. La proliferación celular disminuye en las células deficientes en SCD y no revierte con el agregado de ácido oleico exógeno
7. La deficiencia en SCD induce apoptosis independiente de ceramidas en las células SV40-WI 38
8. Las células hSCDas-A son más sensibles a la apoptosis inducida por ácido palmítico.
9. La disminución de SCD abroga el crecimiento independiente de anclaje de las células transformadas con SV40
10. Tumorigenicidad: Generación del modelo de células A549 deficientes en SCD
11. La deficiencia de SCD incrementa el período de latencia y disminuye el crecimiento tumoral de las células A549 en ratones “*nude*”

Discusión

Conclusión

Referencias

Abreviaturas¹

BSA albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

CE ésteres de colesterol (*cholesterol esters*)

EDTA ácido etilendiaminetetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FBS suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FFA ácidos grasos libres (*free fatty acids*)

GLC cromatografía gas-líquida (*gas liquid chromatography*)

MAPK proteína quinasa activada por mitógenos (*mitogen-activated proteinkinase*)

MEM Medio esencial mínimo

MUFA ácidos grasos monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*)

PBS buffer fosfato salino (*phosphate buffer saline*)

PC fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*)

PI3K fosfatidilinositol 3-quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKC proteína quinasa C (*protein kinase C*)

PL fosfolípidos (*phospholipids*)

PPAR receptor activado por proliferadores peroxisomales (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

PUFA ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*)

SCD esteroil-Coenzima A desaturasa (*stearoyl-CoA desaturase*)

SD desvío estándar (*standard deviation*)

SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*polyacrilamide gel electrophoresis*)

SFA ácidos grasos saturados (*saturated fatty acids*)

SREBP proteína de unión a elementos regulados por esteroil (*sterol regulatory element binding protein*)

SV40 Virus de simio 40 (*simian virus 40*)

TAG triacilgliceroles

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

Introducción

“Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua.”² Dada esta amplia definición, los lípidos conforman un grupo heterogéneo de moléculas que, por tanto, tienen características y funciones diversas.

La característica más importante, desde el punto de vista biológico, de algunos lípidos es la de formar membranas cuando se encuentran en soluciones acuosas. La formación de las membranas celulares fue probablemente uno de los factores cruciales para el desarrollo de la vida en la Tierra. No sólo delimitó un espacio acuoso que pudo diferenciarse químicamente del medio externo sino que, además, permitió la selección de las variedades genéticas más favorables, restringiendo la difusión de sus productos. Si bien las primeras membranas celulares pudieron ser agregados de moléculas anfipáticas simples como los ácidos grasos (*Hanczyc, 2003; Chen, 2004*), actualmente están formadas por moléculas complejas, incluyendo fosfolípidos, esteroides y proteínas, entre otras. Las membranas de las distintas células, así como los sistemas de endomembranas de las células eucariotas, tienen características distintivas relacionadas a su función. Así, las membranas celulares intervienen en numerosos procesos incluyendo la generación, recepción y la transducción de señales, el acoplamiento de reacciones sucesivas, la generación de espacios intracelulares diversos, etc.

Las grasas y aceites (triacilglicéridos) y las ceras tienen otra función biológica importante, la de almacenar energía. Están compuestos por ácidos y alcoholes grasos que, al ser hidrofóbicos y muy reducidos, sirven como depósito concentrado de combustible metabólico. En los organismos superiores los triacilglicéridos se almacenan en células especializadas, los adipocitos. Cuando se necesita energía, los triacilglicéridos son hidrolizados y sus ácidos grasos constituyentes se distribuyen a distintos tejidos en los que son degradados. Según la hipótesis del “gen ahorrativo” (discutida por *Friedman, 2003*), esta capacidad para almacenar energía pudo representar una ventaja adaptativa para los organismos cuya disponibilidad de alimento no era constante.

Algunos lípidos se comportan como mensajeros químicos. Así, las hormonas esteroideas, por ejemplo, transportan mensajes entre diversos tejidos. Otros lípidos participan en la comunicación química entre organismos, actuando como feromonas, o entre distintas partes de una célula, obrando como mensajeros intracelulares. Los compuestos incluidos clásicamente en este grupo son las hormonas esteroideas (hormonas sexuales, adrenocorticales y derivadas de la vitamina D), los eicosanoides (derivados del ácido graso araquidónico), algunos terpenos y los diacilglicéridos.

Otras funciones de los lípidos incluyen el aislamiento térmico, eléctrico y mecánico de estructuras y la lubricación e impermeabilización de superficies. También actúan como

antioxidantes naturales, detergentes, pigmentos, cofactores, transportadores de electrones y glúcidos, y hasta participan en la flotabilidad de algunos organismos.

Si bien las funciones y ejemplos de lípidos descriptos anteriormente son los más conocidos, estudios recientes muestran que el papel de los mismos en la fisiología celular es mucho más amplio.

Las membranas celulares, por ejemplo, ya no son consideradas como un solvente homogéneo en el que se localizan las proteínas. Más bien, el modelo actual propone la existencia de distintos dominios en las membranas, con una composición de lípidos y proteínas distintiva. Estos dominios son estructuras dinámicas cuyo tamaño y composición varía ante distintos estímulos. El microambiente lipídico, a su vez, tiene profundas influencias en la actividad de las proteínas de membrana y, consecuentemente, en procesos tales como la señalización celular (*Smart, 1999; Simons, 2000a*).

La cantidad de moléculas lipídicas con función de mensajeros químicos se ha ampliado notablemente en los últimos años. Así, distintos tipos de lípidos, tales como los lisofosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos o sus derivados, intervienen en procesos celulares tan diversos como la regulación del metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la senescencia y la muerte celular, la angiogénesis y la vasoconstricción, entre otros (*Duplus, 2000; Chawla, 2001; Funk, 2001; Hla, 2001; Merrill, 2002; Hannun, 2002*).

Dada esta amplia variedad de funciones, es necesaria una precisa regulación del metabolismo lipídico para mantener la homeostasia celular. La obesidad, la diabetes, la aterosclerosis y el cáncer son algunos ejemplos de enfermedades cuya aparición y/o progresión ha sido relacionada a alteraciones en el metabolismo lipídico (*Lusis, 2000; Shulman, 2000; Kopelman, 2000; Kahan, 2000; Shureiqi, 2001; Ding, 2003*).

Progresivos estudios en este campo permitirán una comprensión más holística de los procesos celulares en condiciones fisiológicas y patológicas, anteriormente adscriptos principalmente a las proteínas.

En este trabajo estudiamos la relación entre el metabolismo de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y el fenotipo celular neoplásico.

Estado actual del conocimiento

1. Síntesis de ácidos grasos y glicerolípidos: Generalidades

Los ácidos grasos son importantes fuentes de energía metabólica así como componentes esenciales de los fosfolípidos de membrana, de los lípidos de reserva y de diversas moléculas mensajeras.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados endógenamente por la acción conjunta de las enzimas citosólicas acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa. Esta vía rinde principalmente ácido palmítico (16:0), el cual puede ser sustrato de las elongasas, transformándose entonces en ácido esteárico (18:0) (Jayakumar, 1995; Matsuzaka, 2002). Los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico son los principales sustratos de la estearoil-CoA desaturasa, una enzima microsomal que cataliza la desaturación de diversos acil-CoA en configuración *cis* entre los átomos de carbono 9 y 10, denominada por tanto 9-desaturasa (Enoch, 1976). De esta forma se generan los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9). El ácido palmitoleico puede ser a su vez elongado a ácido *cis*-vaccénico (18:1 n-7), un isómero posicional del ácido oleico (Figura I).

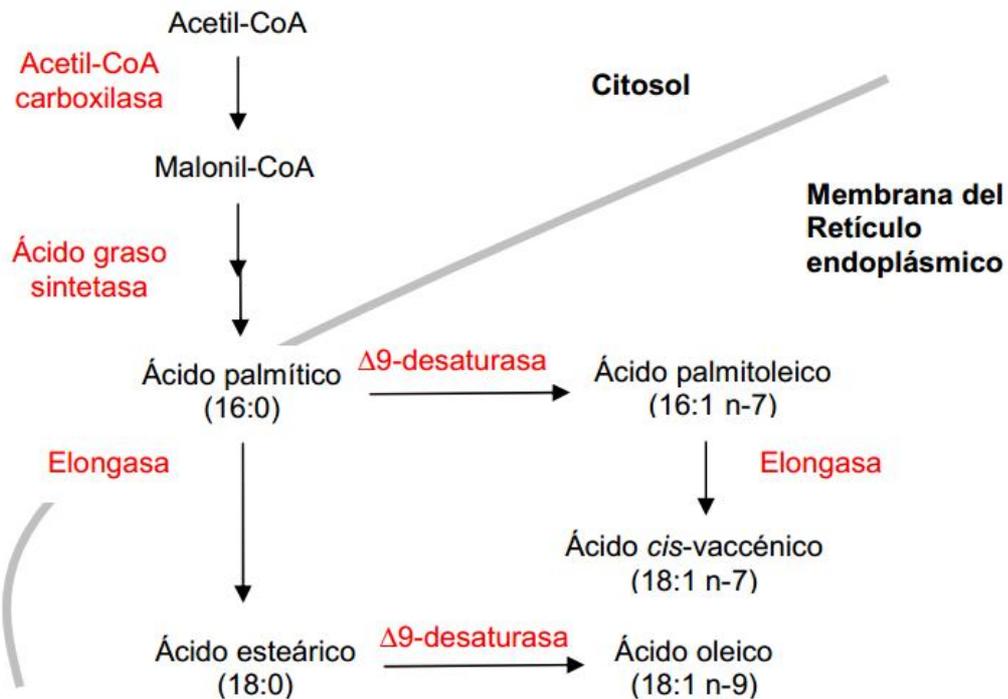


Figura I: Síntesis *de novo*, elongación y $\Delta 9$ -desaturación de ácidos grasos.

Asimismo, los ácidos grasos pueden ser incorporados del medio extracelular

(provenientes de la hidrólisis de los triacilglicéridos adipocitarios o de las lipoproteínas séricas) tanto en forma pasiva como por un mecanismo mediado por proteínas (Schaffer, 2002).

Los animales no pueden desaturar los ácidos grasos más allá del carbono 9, por lo que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) linoleico (18:2 n-6) y - linolénico (18:3 n-3) deben ser incorporados de la dieta y son denominados por tanto “esenciales”. Una vez que estos ingresan en las células, pueden ser sustratos consecutivos de 6 y 5 -desaturasas y elongasas para generar PUFA de cadena más larga, con el patrón de desaturación metileno-interrumpido, característico de los mismos (Nakamura, 2003) (Figura II). La desaturación y elongación sucesivas del ácido oleico para generar PUFA n-9 sólo se produce si existe deficiencia de los ácidos grasos esenciales (Rosenthal, 1987).

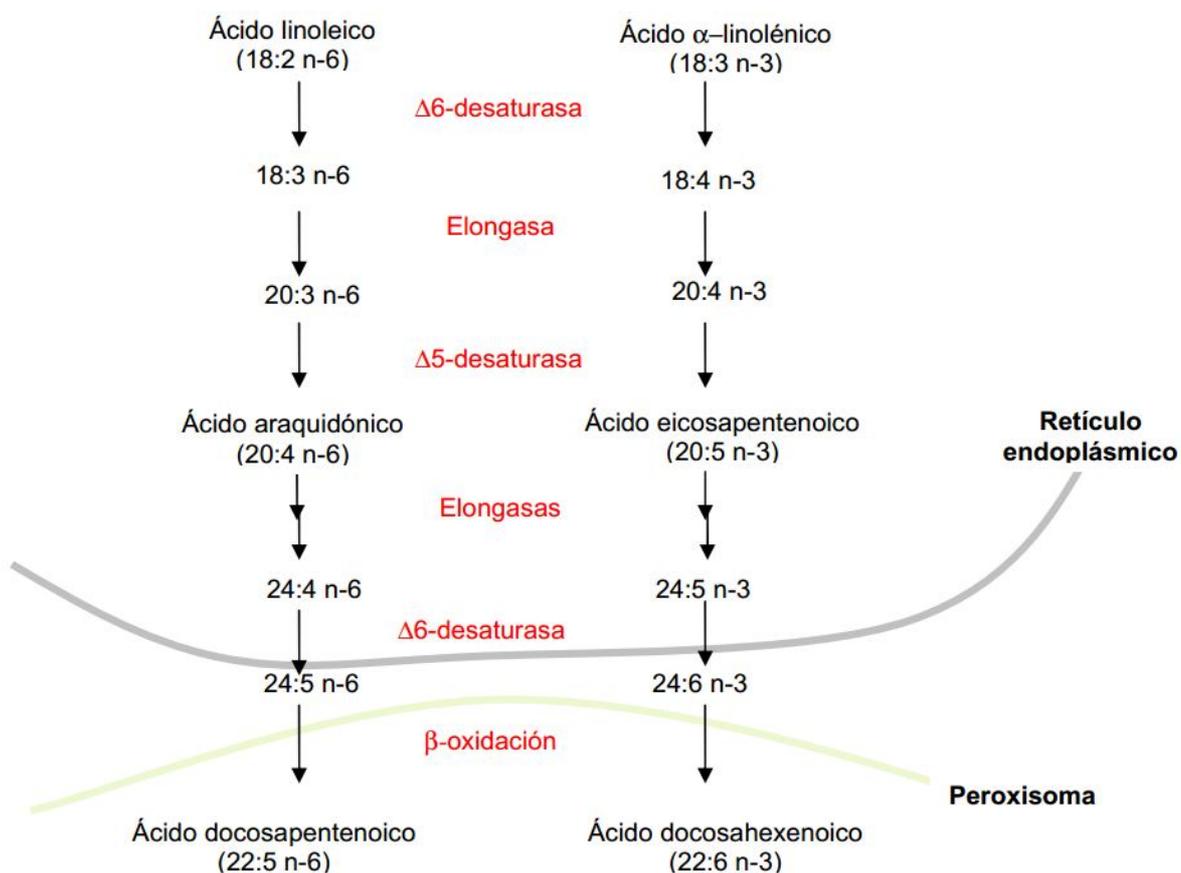


Figura II: Síntesis de PUFA.

Tanto los ácidos grasos sintetizados endógenamente como los exógenos pueden ser utilizados, en su forma activada con coenzima A, en la síntesis de fosfolípidos (PL) y triacilglicéridos (TAG). En la mucosa intestinal, gran parte de los TAG sintetizados provienen de la reaclación del 2-monoacilglicerol, producto de la hidrólisis de los TAG dietarios (Lehner, 1996). En el resto de los tejidos la síntesis de TAG y PL *de novo* procede principalmente de la ruta del ácido fosfatídico. En esta vía metabólica el *sn*-glicerol-3-fosfato, proveniente de la fosforilación del glicerol por la glicerol kinasa o de la reducción de la dihidroxiacetona-fosfato, es acilado en las posiciones *sn*-1 y 2 para producir el ácido fosfatídico (Figura III) (Coleman, 2004). El ácido fosfatídico puede ser utilizado para la síntesis de fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardiolipinas mediante la enzima ácido fosfatídico:CTP citidililtransferasa que cataliza la formación de CDP-diacilglicerol el cual es sustrato para la formación de estos PL aniónicos (Bell, 1980). A su vez, el ácido fosfatídico puede ser desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa-1 para rendir diacilglicerol. El diacilglicerol es sustrato para la síntesis de TAG y PL (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) o puede ser fosforilado por la diacilglicerol kinasa para producir nuevamente ácido fosfatídico.

La única reacción exclusiva de la síntesis de TAG es la acilación en la posición *sn*-3 del diacilglicerol catalizada por la enzima diacilglicerol aciltransferasa. Se han clonado y caracterizado dos diacilglicerol aciltransferasas en mamíferos, denominadas DGAT 1 y 2 (Cases, 1998 y 2001). DGAT 1 se expresa ubicuamente en los tejidos humanos adultos y fetales mientras que DGAT 2 se expresa principalmente en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria.

El diacilglicerol es también necesario para la síntesis del PL mayoritario de las células eucariotas, la fosfatidilcolina. La síntesis de fosfatidilcolina se realiza principalmente por la "ruta de la CDP-colina" (Pelech, 1984; Tijburg, 1989; Jackowski, 2005). En esta vía, la colina es fosforilada por la colina kinasa para producir fosfocolina, en una reacción dependiente de ATP como grupo dador de fosfato. A continuación, la enzima CTP:fosfocolina citidililtransferasa cataliza la reacción limitante de la vía, la producción de CDP-colina (Kent, 1997; Clement, 1999). En humanos y ratones existen dos isoformas de la CTP:fosfocolina citidililtransferasa, denominadas y La isoforma se localiza en el núcleo y retículo endoplásmico mientras que la isoforma lo hace sólo en retículo endoplásmico. Estas enzimas se encuentran en forma soluble inactiva o asociadas a membranas y activas (Friesen, 1999). La CDP-colina es el grupo dador de fosfocolina hacia el diacilglicerol para la formación de fosfatidilcolina, reacción catalizada por la enzima CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa.

La fosfatidiletanolamina se sintetiza a partir de diacilglicerol y CDP- etanolamina mediante una vía análoga a la de la CDP-colina. La fosfatidiletanolamina puede producirse a

su vez por descarboxilación de la fosfatidilserina. La fosfatidilserina es sintetizada en mamíferos a partir de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina por intercambio del grupo de cabeza polar, reacción en la que la serina reemplaza a la colina o etanolamina, respectivamente (*Pelech, 1984; Tijburg, 1989; Vance, 1998*).

Los glicerolípidos pueden a su vez reciclarse. Los productos de hidrólisis de los PL y TAG (lisofosfolípidos, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácidos grasos y compuestos de la cabeza polar de los PL) pueden ser utilizados para la resíntesis de nuevos glicerolípidos.

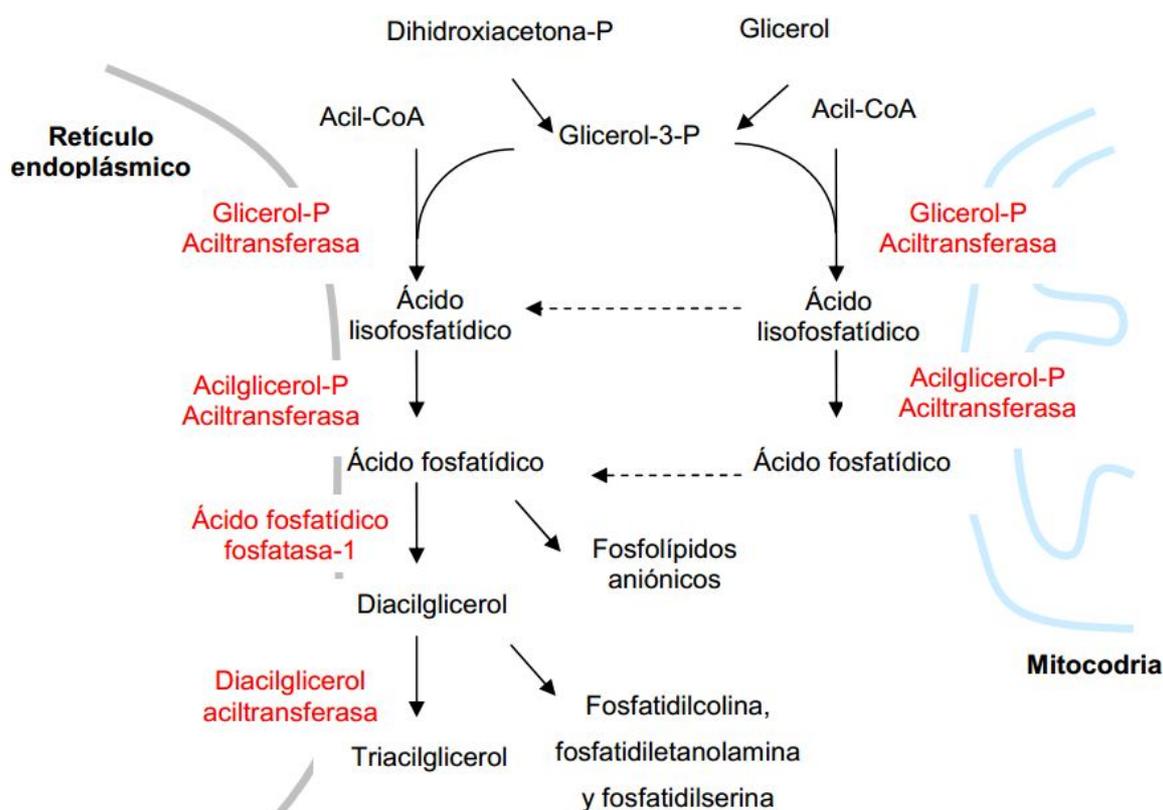


Figura III: Biosíntesis de glicerolípidos

2. Esteroil-CoA Desaturasa

La Esteroil-CoA Desaturasa (SCD) es una enzima microsomal que cataliza la inserción del primer doble enlace, en posición 9-*cis*, en varios ácidos grasos saturados para formar sus derivados monoinsaturados. La reacción catalizada por esta enzima, esquematizada en la Figura IV, requiere de oxígeno, NAD(P)H y una cadena de transporte de electrones microsomal, compuesta por la enzima citocromo b5-reductasa y el citocromo b5 (Strittmatter, 1974). Sus principales sustratos son los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) en su forma activada, es decir, unidos a la Coenzima A (CoA) (Enoch, 1976). La 9-desaturación de estos acil-CoA rinde los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9), respectivamente.

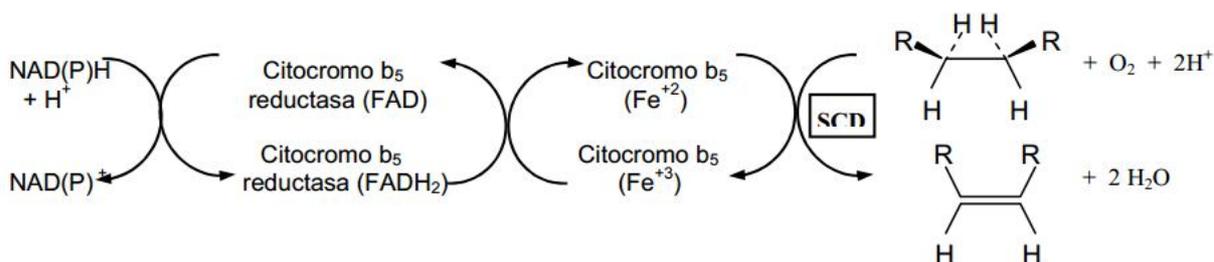


Figura IV: Cadena de transporte de electrones microsomal involucrada en la desaturación de ácidos grasos por la Esteroil-CoA Desaturasa (SCD).

Distintos genes de la SCD han sido clonados y estudiados en numerosos mamíferos, incluyendo ratones (Ntambi, 1988; Kaestner, 1989; Zheng, 2001; Miyazaki, 2003), ratas (Thiede, 1986), caprinos (Yahyaoui, 2001), bovinos (Chung, 2000) y el hombre (Zhang L, 1999 y 2001; Bené, 2001; Beiraghi, 2003; Zhang S, 2004; Wang J, 2005). En levaduras existe una 9-desaturasa cuya función puede ser reemplazada por el gen de la SCD de rata, lo que indica que esta enzima está muy conservada en la escala filogenética (Stukey, 1990).

En ratones existen cuatro isoformas de la SCD (SCD1 a 4), codificadas por distintos genes, cuyo patrón de expresión difiere en los distintos tejidos (Ntambi, 1988; Kaestner, 1989; Zheng, 2001; Miyazaki, 2003). En 1999, Zhang y colaboradores, clonaron el gen de la SCD humana (hSCD) ubicado en el cromosoma 10, y un pseudogen, transcripcionalmente inactivo, en el cromosoma 17. El análisis de la secuencia del marco abierto de lectura del cADN reveló una alta similitud con los de las SCD1 y 2 de ratón y rata. Sin embargo, la región 3'-no traducida (3'-UTR) humana muestra una menor identidad de secuencia con su correspondiente murina. Más aún, en esta región existen dos señales de poliadenilación, que dan lugar a la generación de dos transcritos de 5.2 y 3.9 kb, que no se encuentran en roedores. Recientemente se identificó en el cromosoma 4 la presencia de otro gen (ACOD4)

que codifica una acil-CoA desaturasa humana (*Beiraghi, 2003*). Estudios posteriores revelaron que la enzima codificada por este gen es una estearoil-CoA desaturasa (*Zhang, 2004; Wang, 2005*). Sin embargo, la secuencia predicha de aminoácidos presenta una menor similitud e identidad con las otras isoformas de SCD, tanto humana como murinas, por lo que se la denominó hSCD5 (*Wang, 2005*).

La estructura deducida de la secuencia de aminoácidos en distintos organismos sugiere que las 9-desaturasas, así como otras desaturasas de membrana, presentan dos dominios transmembrana y tres motivos ricos en histidinas, hacia la cara citosólica de la membrana microsomal, que podrían intervenir en la unión al hierro, necesario para la función de esta enzima (*Stukey, 1990; Shanklin, 1994*).

La SCD humana se expresa en numerosos tejidos, siendo particularmente abundante en tejido adiposo, hígado, cerebro, corazón y pulmón (*Zhang, 1999*). La hSCD5 se expresa principalmente en cerebro y riñón fetal y en cerebro, páncreas y riñón adultos (*Zhang, 2004; Wang, 2005*).

Las 9-desaturasas están reguladas a nivel transcripcional y post-transcripcional por numerosos factores dietarios, hormonales y de desarrollo, así como por distintas drogas, en diversos organismos. Algunos de los factores reguladores de las SCD, tanto extra como intracelulares, se detallan a continuación.

	Regulador	Determinación	Modelo, Tejido/Célula *	Cita
(+)	Insulina	Actividad enzimática Transcripción, mARN	Rata, hepatocito, Ratón, adipocito Ratón, adipocito	<i>Prasad, 1979</i> <i>Kasturi, 1982</i> <i>Weiner, 1991</i>
(+)	Glu, Fru, H de C	Actividad enzimática	Rata, hepatocito Ratón, hepatocito, adipocito, riñón y pulmón	<i>Prasad, 1979</i> <i>Kaestner, 1989; Ntambi, 1992</i>
(-)	PUFA	Actividad enzimática Transcripción “ de gen reportero Estabilidad del mARN	Rata, hepatocito Ratón, hepatocito Humano, hepatocito Ratón, adipocito	<i>de Alaniz, 1986</i> <i>Ntambi, 1992; Landschulz, 1994</i> <i>Bené, 2001</i> <i>Sessler, 1996</i>
(+) (-)	Colesterol	Actividad enzimática mARN Transcripción de gen reportero	Rata, hepatocito Ratón, hepatocito Humano, hepatocito	<i>Leikin, 1987 y 1988</i> <i>Kim, 2002</i> <i>Bené, 2001</i>
(+)	Desarrollo del SNP	Actividad enzimática mARN	Ratón, nervio ciático	<i>Garbay, 1998</i>
(+)	SREBP 1a y 2	Actividad enzimática mARN Transcripción de gen reportero	Ratón, hepatocito Humano, hepatocito	<i>Shimomura, 1998</i> <i>Bené, 2001</i>
(-)	Senescen- cia	Actividad enzimática mARN	Ratón, hipocampo	<i>Kumark, 1999</i>
(+)	Ácido retinoico	Actividad enzimática mARN	Humano, células epiteliales de retina	<i>Samuel, 2002</i>
(-)	Leptina	Actividad enzimática, mARN y proteína	Rata, hepatocito	<i>Kakuma, 2002; Cohen, 2002</i>
(+)	Desarrollo pulmonar	mARN	Rata, pulmón	<i>Zhang, F., 2004</i>
(-)	Ácido estercúlico	Actividad enzimática	Rata, hepatocito	<i>Jeffcoat, 1977</i>
(-)	S-FA	Actividad enzimática	Rata, hepatocito	<i>Høvik, 1997</i>
(+) (-)	Tiazolidine- dionas	mARN	Ratón, preadipocito Ratón, adipocito	<i>Li, Y., 2002</i> <i>Kurebayashi, 1997</i>
(+)	Estradiol	Actividad enzimática	Gallo, hepatocito	<i>Lippiello, 1979</i>
(-)	Etanol	Actividad enzimática	Rata, hepatocito	<i>Rao, 1984</i>
(-)	TGF	Transcripción, mARN	Ratón, adipocito	<i>Weiner, 1991</i>
(+)	TGF	Actividad enzimática, mARN	Humano, células epiteliales de retina y fibroblastos	<i>Samuel, 2002</i>
(+)	Baja temperatura	Actividad enzimática, proteína y mARN	Carpa, hepatocito	<i>Tiku, 1996</i>
(+)	PPAR 2	mARN	Ratón, preadipocito	<i>Li Y., 2002</i>
(+) SE	PPAR	mARN	Ratón, hepatocito Humano, hepatocito	<i>Miller, 1996</i> <i>Hsu, 2001</i>
(+)	PDGF, FGF y EGF	Actividad enzimática, proteína y mARN	Humano, fibroblasto Ratón, fibroblasto	<i>Demoulin, 2004</i>
(+)	KGF	mARN	Rata, células alveolares tipo II	<i>Mason, 2003</i>
(-)	CLA	Actividad enzimática y proteína	Humano, células de cáncer de mama	<i>Choi, 2002</i>

Tabla I: Regulación de las 9-desaturasas.

Clave: (+), regulación positiva; (-), regulación negativa; SE, sin efecto; Glu, glucosa; Fru, fructosa; H de C, hidratos de carbono; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; SNP, sistema nervioso periférico; SREBP, proteínas de unión a elementos regulados por esteroles; S-FA, ácidos grasos azufrados; TGF, factor de crecimiento transformante; PPAR, receptor activado por proliferadores peroxisomales; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; EGF, factor de crecimiento epidérmico; KGF, factor de crecimiento de queratinocitos; CLA, ácido linoleico conjugado

* Por simplicidad, no se hace distinción entre tejidos y líneas celulares. Así, “hepatocito” y “adipocito” indican una determinación realizada en hígado y tejido adiposo, respectivamente, o en cultivo de células *in vitro*.

La precisa regulación de la SCD, al menos de la isoforma SCD1 hepática de rata, también es posible gracias a su corta vida media, dada por la actividad de proteasas microsomales que promueven específicamente su degradación (Ozols, 1997; Heinemann, 1998 y 2003; Mziaut, 2000). Así, la regulación a nivel transcripcional y postranscripcional permiten ajustar rápidamente el contenido de la SCD en relación a las necesidades de la célula.

Es sorprendente el grado de regulación de la SCD, así como la presencia de distintas isoformas, cuando se considera que el principal ácido graso sintetizado por esta enzima, el ácido oleico, es uno de los más abundantes en la dieta.

El conocimiento de las funciones de la SCD, en especial el de la SCD1 murina, se ha incrementado notablemente con el estudio de animales deficientes en esta enzima. Tanto los ratones asebía, que presentan una mutación natural del gen de la SCD1 (Zheng, Y, 1999) como aquellos *scd1* ^{-/-}, generados por ingeniería genética, muestran alteraciones en la piel que incluyen la atrofia de las glándulas sebáceas, mayor pérdida de agua transepidermica, y menor cubierta de pelos que sus contrapartes +/- (heterocigotas) o +/+ (cepa salvaje) (Sundberg, 2000; Miyazaki, 2001a). Asimismo, en los ratones deficientes en SCD1 el contenido de triacilglicéridos y ésteres de colesterol está disminuido tanto en piel como en hígado y plasma, mientras que el colesterol plasmático está incrementado (Sundberg, 2000; Miyazaki, 2000, 2001a y b). El contenido hepático de fosfolípidos totales no se ve alterado (Miyazaki, 2001b) aunque aumenta la proporción de fosfatidilcolina (Dobrzyn, 2005). Adicionalmente, en el hígado de estos ratones, existe una disminución en la expresión de genes lipogénicos, (glicerolfosfato- aciltransferasa, ácido grasos sintetasa y proteínas de unión a elementos regulados por esteroides (SREBP)) y un aumento en la expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos (carnitina-palmitoiltransferasa 1, acil-CoA oxidasa) así como la -oxidación de los mismos (Ntambi, 2002; Dobrzyn, 2004).

A su vez, a pesar de que consumen más alimento que los "wild type", los ratones deficientes en SCD1 exhiben menor peso corporal y menor adiposidad aún bajo una dieta lipogénica (Cohen, 2002; Ntambi, 2002). Más aún, la disminución de la 9-desaturasa 1 reduce el peso corporal y la acumulación de lípidos de ratones genéticamente obesos (Cohen, 2002). Por otra parte, los niveles plasmáticos de insulina durante el ayuno, así como su cascada de señalización en músculo esquelético, están incrementados en los ratones machos *scd1* ^{-/-}, lo que podría explicar su mayor tolerancia a la glucosa (Ntambi, 2002; Rahman, 2003). En las hembras los cambios son menos evidentes.

Tanto en el hígado como en la piel y el tejido adiposo de los ratones con "knockout" para el gen de la SCD1, el contenido de ácidos grasos saturados está incrementado, mientras que el de ácidos grasos monoinsaturados está disminuido (Miyazaki, 2001a). Sorprendentemente, las dietas lipogénicas o suplementadas con ácidos grasos

monoinsaturados no corrigen la deficiencia de triacilglicéridos y ésteres de colesterol hepáticos, ni el perfil de ácidos grasos (Miyazaki, 2000, 2001 a y b).

En conjunto, los datos recogidos de modelos murinos de deficiencia de SCD sugieren que la producción endógena de ácidos grasos monoinsaturados es imprescindible para la síntesis y secreción de lípidos de reserva por el hígado, así como para la acumulación de lípidos en adipocitos y el balance tisular del perfil de ácidos grasos. Asimismo, al modificar la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético, la actividad de la SCD podría también alterar el metabolismo de los glúcidos. De esta forma, la modificación en la actividad de la SCD podría estar relacionada al desarrollo o progresión de enfermedades como la obesidad y la diabetes, como fuera reportado por otros autores (Enser, 1975; Prasad, 1979; Jones, 1996; Nadler, 2000; Li J., 2002; Montanaro, 2003).

Otra patología que ha sido relacionada a alteraciones en la actividad 9- desaturasa es el cáncer. La expresión de la SCD humana aparece aumentada en carcinomas de colon y esófago, en adenomas hepatocelulares y en líneas celulares de cáncer de mama (Li J, 1994; Kumar-Sinha, 2003). También se ha descrito un aumento en la expresión de distintas isoformas de SCD en modelos de carcinogénesis mamaria y hepática inducida químicamente en roedores (Lu, 1997; Thai, 2001). A su vez, el tratamiento de ratas con ácido esteárico (sustrato de la SCD) o con ácido estercúlico (un inhibidor de la SCD) disminuye el crecimiento de tumores mamarios inducidos químicamente en ratas (Habib, 1987; Khoo, 1991). En este sentido, el ácido esteárico también disminuye el crecimiento y la invasión *in vitro* de células tumorales humanas (Habib, 1987; Singh, 1995). Más aún, cepas de ratas y ratones que presentan predisposición a la hepatocarcinogénesis muestran una mayor expresión del gen de la *scd1* que cepas menos susceptibles a esta patología (Falvella, 2002). Recientemente, Horie y colaboradores (2004) reportaron que la delección hepática del gen que codifica para PTEN, un gen supresor tumoral (Li Jing, 1997; Tamura, 1998), induce la expresión del gen de la 9-desaturasa 1 murina con el consiguiente aumento de la proporción de ácidos grasos monoinsaturados/saturados. Finalmente, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados y el nivel y la actividad de la SCD también se exhiben incrementados en células murinas y humanas transformadas (Ruggieri, 1979; Scaglia, 2005).

Surgen entonces algunas preguntas respecto de la conexión entre la SCD y el cáncer. ¿Cuál es la relación entre esta enzima, vinculada principalmente al metabolismo de los lípidos de reserva, al menos en ratones, y la transformación neoplásica? ¿El aumento de la SCD confiere alguna ventaja selectiva a las células tumorales que poseen esta característica?. ¿Cuál es la función de la SCD en las células transformadas?. Para responder a estas preguntas debemos primero considerar cuál puede ser la relación entre los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y la característica más distintiva de las células tumorales, es decir, la desregulación de su crecimiento.

3. La proliferación celular y la síntesis de membranas

a. Fosfolípidos

Toda célula necesita duplicar sus membranas antes de dividirse. En concordancia con ello, factores que inducen la proliferación de las células normales en cultivo, como la adhesión al sustrato y los factores de crecimiento, promueven la síntesis de membranas (Page, 1997; Demoulin, 2004).

La síntesis de fosfatidilcolina, el fosfolípido mayoritario en las membranas celulares, está coordinada con la progresión del ciclo celular y su masa se incrementa durante la fase de síntesis o "fase S" (Jackowski, 1994). Esto se logra gracias a un aumento en la expresión de la enzima limitante de la velocidad de síntesis de fosfatidilcolina, la CTP:fosfocolina citidililtransferasa, y una disminución de la hidrólisis de este fosfolípido durante la fase S (Jackowski, 1994; Golfman, 2001). La enzima limitante de la velocidad de síntesis del colesterol, la 3-hidroxi 3-metilglutaril-CoA reductasa, también se incrementa inmediatamente antes o durante la fase S (Siperstein, 1984). A su vez, la tasa de síntesis de los principales componentes de las membranas celulares, los fosfolípidos y el colesterol, está coordinada entre sí y es proporcional a la tasa de proliferación celular, siendo mayor en células en crecimiento que en células diferenciadas o quiescentes (Cornell, 1980). En este sentido, la deficiencia de colina del medio de cultivo disminuye la síntesis de fosfatidilcolina y acumula a las células en la fase G1 (Tercé, 1994). En este trabajo se reportó asimismo que la adición de colina o lisofosfatidilcolina, precursores de la fosfatidilcolina, revierte el estado de arresto celular. Más aún, las células de ovario de hámster chino (CHO) conteniendo una mutación termosensible en el gen de la CTP:fosfocolina citidililtransferasa muestran, a la temperatura restrictiva, una notable disminución en el contenido de fosfatidilcolina que conlleva a la muerte celular por apoptosis (Cui, 1996). La reducción de la síntesis de fosfatidilcolina también disminuye la viabilidad de células tumorales (Yen, 1999; Finney, 2000). La adición de fosfatidilcolina exógena, o precursores de su síntesis, así como la sobreexpresión de la enzima CTP:fosfocolina citidililtransferasa, previene parcial o totalmente la apoptosis inducida por inhibidores de la síntesis de este fosfolípido (Boggs, 1995; Miquel, 1998; Baburina, 1998; Anthony, 1999). En conjunto, estos datos demuestran que la síntesis de fosfatidilcolina es necesaria para la progresión del ciclo celular así como para mantener la viabilidad de celular.

La SCD podría estar relacionada a la síntesis de membranas durante la proliferación celular. Demoulin y colaboradores (2004) observaron que el tratamiento de células normales con factores de crecimiento indujo un aumento en la expresión de distintas enzimas lipogénicas (entre ellas la ácido grasos sintetasa y la SCD) y en la síntesis de lípidos de membrana. La relación entre los ácidos grasos insaturados y saturados sintetizados *de novo* se incrementó notablemente, lo que sugiere que podrían producirse cambios en la

composición de las membranas durante la proliferación celular y que la SCD podría estar involucrada en la modulación de los mismos.

A su vez, el ácido oleico y otros ácidos grasos insaturados estimulan la actividad de la enzima CTP:fosfolina citidililtransferasa y, consecuentemente, la síntesis de fosfatidilcolina, en mayor medida que los ácidos grasos saturados (*Weinhold*, 1984 y 1991; *Wang*, 1993, *Craig*, 1994).

b. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son constituyentes esenciales de los fosfolípidos celulares. Numerosas células tumorales sobrepresan la enzima ácido graso sintetasa y la síntesis de ácidos grasos *de novo* está incrementada respecto a las células normales (*Kuhajda*, 1994; *Welsh*, 2001; *Rossi*, 2003). Más aún, el grado de expresión de la ácido grasos sintetasa correlaciona fuertemente con la agresividad del tumor (*Camassei*, 2003; *Takahiro*, 2003). Los ácidos grasos sintetizados *de novo* se utilizan principalmente en la acilación de fosfolípidos y la inhibición de la ácido grasos sintetasa disminuye la incorporación de estos ácidos grasos en los acilglicéridos al tiempo que reduce el crecimiento celular *in vitro*, a pesar de las concentraciones fisiológicas de ácidos grasos exógenos (*Kuhajda*, 1994). Más aún, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que células transformadas con SV40 presentan una activa síntesis de ácidos grasos *de novo* y una menor incorporación de ácidos grasos exógenos (*Scaglia*, 2005). Por otra parte, la inhibición de la ácido graso sintetasa disminuye la proliferación *in vitro* e *in vivo* de numerosos modelos de células tumorales, siendo inocuos para las células normales (*Kuhajda*, 2000; *Gabrielson*, 2001; *Kridel*, 2004; *Alli*, 2005). En conjunto, estos datos sugieren que las células transformadas muestran una mayor dependencia de la síntesis endógena de ácidos grasos que las células normales para la supervivencia y proliferación.

La enzima ácido graso sintetasa produce ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico, a partir de acetato (*Jayakumar*, 1995). Sin embargo, las membranas celulares contienen distintos tipos de ácidos grasos y, de hecho, la composición de los fosfolípidos de membrana puede afectar distintas funciones celulares, por lo que el contenido de ácidos grasos de las mismas ha de estar altamente regulado. La baja utilización de las especies disaturadas de diacilglicerol para la síntesis de fosfolípidos de membrana podría proveer de un mecanismo para la regulación de las características de las mismas (*Sundler*, 1974)

La composición de los fosfolípidos de membrana puede alterar el transporte mediado por proteínas, la actividad de receptores y enzimas unidas a membrana, la fagocitosis y el crecimiento celular (*Gould*, 1982; *Whitcomb*, 1988; *Field*, 1990; *Ledoux*, 2003; *Spector*, 1985). Más aún, la composición de ácidos grasos puede modificar las propiedades físicas de las membranas, tales como la fluidez (*King*, 1978). Los ácidos grasos tienen asimismo un importante papel en la estructuración de los dominios de membrana. Los rafts y caveolas son

dominios enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos acilados con ácidos grasos saturados, rodeados de dominios más fluidos enriquecidos en ácidos grasos insaturados. Estos dominios son estructuras dinámicas que intervienen en distintos procesos incluyendo la señalización, la endocitosis y la adhesión celular (*Smart, 1999; Simons, 2000a; Vereb, 2003; Upla, 2004; del Pozo, 2004*). La sobreexpresión de la SCD1 disminuye el contenido de rafts lipídicos en células CHO (*Sun, 2003*)

En este contexto, la SCD podría ser necesaria para mantener la composición de los ácidos grasos y la estructuración de las membranas, evitando así el enriquecimiento en ácidos grasos saturados provenientes de la activa síntesis *de novo* de las células transformadas. De hecho, la inducción de apoptosis está asociada a un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados y una disminución de los ácidos grasos monoinsaturados en los fosfolípidos celulares, así como con la reducción de la SCD o el descenso en la fluidez de membrana en distintos modelos celulares (*Singh, 1996; Scaglia, 2005; Chen, 2004*). A su vez, se ha reportado un aumento en la fluidez de membrana en células neoplásicas (*Barnett, 1974; Sok, 1999 y 2002; Scaglia, 2005*), aunque se conoce poco de sus causas o implicancias biológicas. Más aún, las células murinas y humanas transformadas con el oncovirus SV40 presentan un aumento de la relación ácidos grasos monoinsaturados/saturados, con una disminución en el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados (*Ruggieri, 1979; Scaglia, 2005*).

c. Triacilglicéridos

La función más estudiada de los triacilglicéridos (TAG) es la de servir como reserva de energía metabólica. Sin embargo, si bien los adipocitos son las células especializadas para el almacenamiento de los mismos y su metabolismo está regulado por las demandas energéticas del organismo, existe una cantidad pequeña de TAG en todas las células (*Coleman, 2004*) y estos pueden estar relacionados con funciones adicionales como la provisión de sustratos lipídicos y la señalización intracelular (*Caviglia, 2003; Bagnato, 2003*).

Los TAG de las células no adiposas pueden actuar como reservorio de sustratos para la síntesis de fosfolípidos de membrana. El diacilglicerol y los ácidos grasos son sustratos de la síntesis de fosfolípidos y TAG, así como productos de su hidrólisis, y pueden reciclarse entre ambos tipos de lípidos. Así, cuando la síntesis de fosfatidilcolina está inhibida, los ácidos grasos y el diacilglicerol sintetizados *de novo* son canalizados hacia la síntesis de TAG (*Jackowski, 2000*). De la misma manera, la disminución del reciclado de los productos de hidrólisis de los TAG hacia fosfolípidos, conlleva a un aumento en la resíntesis de TAG y acumulación de los mismos (*Igal, 1996*). Más aún, la sobreexpresión de la enzima CTP:fosfocolina citidililtransferasa, induce un aumento en la síntesis de fosfatidilcolina al tiempo que disminuye la síntesis de TAG (*Jackowski, 2000*). La misma relación se ha

observado desde un enfoque opuesto. Es decir, la sobreexpresión de la enzima que cataliza el último paso en la síntesis de TAG, la diacilglicerol-aciltransferasa, promueve la síntesis y acumulación de TAG, privando a las células de sustratos para la síntesis de fosfolípidos (Bagnato, 2003).

4. Muerte celular y lipotoxicidad

El crecimiento neto de una población celular está dado tanto por la tasa de proliferación como por la de la muerte celular. La apoptosis, o “muerte celular programada”, es un proceso fisiológico muy importante tanto durante el desarrollo embrionario como el postembrionario y la desregulación de la misma puede tener implicancias en la patogenia de distintas enfermedades. Así, la apoptosis está exacerbada en enfermedades neurodegenerativas e inmunitarias mientras que su disminución puede conllevar al desarrollo de tumores.

El término “lipoapoptosis” (o “lipotoxicidad”) hace referencia a proceso por el cual la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos deviene en la disfunción y muerte celular (Revisado por Unger, 2002a y b; Schaffer, 2003). A pesar de que existen numerosas evidencias que apoyan la presencia de un fenómeno lipotóxico en diversos modelos experimentales, aún no está claro el papel de los TAG en este mecanismo. Por un lado, la acumulación de TAG está frecuentemente asociada a la apoptosis y disfunción celular (Finstad, 1998; Shimabukuro, 1998a). Sin embargo, se ha propuesto que la síntesis de TAG protege a las células de los efectos deletéreos del exceso de los ácidos grasos libres (Cnop, 2001; Listenberger, 2003). De todas formas, la hidrólisis de estos TAG resultaría nuevamente en un aumento de los ácidos grasos intracelulares (Zhou, 2000).

Existe mayor consenso acerca de la inducción de citotoxicidad por el exceso de ácidos grasos. La incubación de células *in vitro* con ácidos grasos o el incremento patológico de los ácidos grasos plasmáticos en modelos animales y en humanos, resultan en la acumulación de lípidos en células - pancreáticas, en músculo esquelético y cardiomiocitos, relacionada con el desarrollo de diabetes (Shimabukuro, 1997 y 1998; Unger, 2001; Lupi, 2002), insulino resistencia (Dresner, 1999; Storz, 1999; Sinha, 2004) y cardiomiopatías (Zhou, 2000; Dyntar, 2001), respectivamente. Sin embargo, existe un efecto diferencial de los distintos ácidos grasos respecto a la citotoxicidad celular. Más de veinte años atrás, se observó que la adición de ácidos grasos saturados al medio de cultivo disminuye el crecimiento celular *in vitro*, siendo el ácido palmítico (16:0) el agente más potente. Más aún, la coincubación de las células con ácido oleico (18:1 n-9), suprime completamente el efecto antiproliferativo del ácido palmítico (Urade, 1982). Desde entonces, numerosos trabajos han mostrado que los ácidos grasos saturados, principalmente el ácido palmítico y esteárico, de 16 y 18 carbonos respectivamente, inducen apoptosis en células -pancreáticas (Maedler, 2001), cardiomiocitos (de Vries, 1997), células mesangiales (Mishra, 2005), neuronas (Ulloth, 2003) y células de

cáncer de mama (*Hardy, 2000*). En estos modelos experimentales, los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico y oleico (16:1 n-7 y 18:1 n-9) previenen la muerte celular inducida por los ácidos grasos saturados. Más aún, la incubación con ácido oleico promueve la proliferación de las células de cáncer de mama (*Hardy, 2000*). Respecto de los ácidos grasos poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces) existen discrepancias entre distintos modelos celulares. En células endoteliales, los ácidos grasos poliinsaturados inducen apoptosis y el efecto se incrementa con la longitud de la cadena y el número de insaturaciones (*Artwohl, 2003*). En células tumorales, sin embargo, promueven la proliferación celular y en este caso el efecto decrece con la longitud y grado de insaturación (*Hardy, 2003*). El ácido oleico fue también, en estos modelos celulares, el ácido graso más potente en el establecimiento de resistencia a la apoptosis e inducción del crecimiento celular, respectivamente.

La SCD, al convertir los ácidos grasos saturados en sus derivados monoinsaturados, podría jugar un importante papel en la modulación de la lipotoxicidad. De hecho, *Listenberger y colaboradores (2003)* reportaron que la sobreexpresión de la SCD1 murina protege a las células CHO de los efectos citotóxicos de la sobrecarga de ácido palmítico exógeno. Se desconoce, sin embargo, la importancia de esta enzima en la regulación del metabolismo y destino de los ácidos grasos en condiciones fisiológicas.

5. Mecanismos propuestos

El efecto diferencial de los distintos ácidos grasos en la inducción de muerte celular o proliferación celular, probablemente esté relacionado al distinto destino metabólico de los mismos. Se ha reportado que el ácido palmítico, pero no el oleico, disminuye el recambio de cardiolipinas y altera la función mitocondrial (*Hardy, 2003*) promoviendo de esta manera la muerte celular. El efecto protector del ácido oleico está relacionado, en algunos modelos celulares, a su capacidad de vehiculizar el ácido palmítico hacia los TAG y, por tanto, lejos de las vías metabólicas proapoptóticas (*Listenberger, 2003; Hardy, 2003*). Finalmente, el papel de los distintos ácidos grasos (saturados y monoinsaturados) respecto a la proliferación y muerte celular ha sido adscripto, en algunos casos, a su capacidad de modular diferencialmente algunas cascadas de señalización.

La lipotoxicidad inducida por elevadas concentraciones de ácidos grasos puede deberse al aumento de la síntesis *de novo* de ceramidas en algunos modelos (*Shimabukuro, 1998a y b; Zhou, 2000; Lupi, 2002*) aunque no en todos (*Listenberger, 2001; Berge, 2003*). Las ceramidas actúan como segundos mensajeros en distintas cascadas de señalización que van desde la proliferación y diferenciación hasta el arresto y la senescencia celular. Sin embargo, el principal efecto de las ceramidas en distintos modelos celulares es la inducción

de apoptosis (Jayadev, 1995; Venable, 1995; Mathias, 1998; Hannun, 2000).

El ácido palmítico (y en menor medida el esteárico), en su forma activada con coenzima A, es el principal sustrato de la enzima serina- palmitoiltransferasa, que cataliza la primera reacción de síntesis *de novo* de ceramidas (Merrill, 1985). Uno de los factores que afecta más directamente la actividad de la serina-palmitoiltransferasa es la disponibilidad de serina y palmitoil-CoA (Merrill, 2002).

Los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico promueven la síntesis endógena de ceramidas en células hematopoyéticas y -pancreáticas, al tiempo que inducen la muerte celular (Paumen, 1997; Maedler, 2001). Ambos fenómenos se incrementan cuando se inhibe el pasaje de estos ácidos grasos hacia las mitocondrias mientras que la inhibición de la síntesis de ceramidas disminuye la apoptosis inducida por el ácido palmítico.

En algunos modelos celulares, el efecto mitogénico del ácido oleico está ligado a la estimulación de distintas isoformas de las proteínas kinasas C (Lu, 1996; 1998a y b; Hardy, 2005). Las proteínas kinasas C (PKC) son una familia de proteínas que participan en numerosas cascadas de señalización (Nishizuka, 1995). Desde el descubrimiento de que los ésteres de forbol (potentes promotores tumorales) activan a las PKC (Castagna, 1982), numerosos estudios han vinculado a estas kinasas con el desarrollo del cáncer. Así, se ha reportado que las PKC participan en la regulación de la proliferación, la apoptosis, la sensibilidad a quimioterápicos, la neovascularización y la capacidad de metástasis en distintos modelos de neoplasia (Reddig, 1999; Yoshiji, 1999; Mandil, 2001; Gökmen-Polar, 2001; Jansen, 2001; Clark, 2003).

Distintos trabajos han mostrado que los ácidos grasos *cis*-insaturados, pero no los saturados, en su forma libre y como componentes de la fosfatidilserina, son importantes activadores de las PKCs (Murakami, 1986; Días-Guerra, 1991; Shinomura, 1991; Khan, 1993; Du, 2001). Sin embargo, se ha reportado que la apoptosis inducida por los ácidos grasos saturados está supeditada a la activación de PKC (Eitel, 2003), una isoforma que ha sido vinculada a la muerte celular (Mandil, 2001; Carpenter, 2002). Se desconoce el mecanismo por el cual los ácidos grasos saturados podrían modular a las PKC.

Otra cascada de señalización que se observa afectada diferencialmente por distintos ácidos grasos es la que comprende a las proteínas fosfatidilinositol 3-kinasas (PI3K). Las PI3K catalizan la fosforilación de diversos fosfatidilinositoles en el 3'-OH del inositol. Uno de sus productos, el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (o PIP3) participa en la regulación de diversos procesos celulares entre los que se incluyen la promoción de la proliferación, el crecimiento y la supervivencia celular, y desempeña un importante papel en la carcinogénesis (Cantley, 2002; Vara, 2004; Bjornsti, 2004; Samuels, 2004). El grupo de Prentki ha reportado que, en células de cáncer de mama, el ácido oleico incrementa la actividad PI3K mientras que el ácido palmítico la disminuye. Más aún, la proliferación celular inducida por el ácido oleico disminuye notablemente cuando se inhibe químicamente la vía

de la PI3K (*Hardy*, 2000 y 2005). Incluso, la protección que los ácidos grasos insaturados ejercen sobre la apoptosis inducida por ácidos saturados, en células - pancreáticas, revierte al inhibirse la actividad de la PI3K (*Beeharry*, 2004). Por otra parte, el ácido palmítico también inhibe a la proteína kinasa B, un efector de PI3K, en células musculares (*Storz*, 1999; *Cazzoli*, 2001).

En resumen, por lo descripto hasta aquí, la regulación del contenido de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados aparece como un potencial determinante de la síntesis y homeostasis de las membranas celulares, la lipotoxicidad y la modulación de algunas cascadas de señalización. Sin embargo, poco es lo que se sabe al respecto, especialmente en las cascadas de señalización. Se conoce aún menos acerca de la relación entre estos procesos y los ácidos grasos sintetizados endógenamente.

6. Características fenotípicas de las células transformadas

Partiendo del origen uniclonal de las células tumorales, el desarrollo neoplásico es considerado como un proceso en múltiples etapas durante el cual las células adquieren progresivamente características que les confieren ventajas adaptativas (*Varner*, 1996; *Evans*, 1998; *Meyer*, 1998; *Coussens*, 2002; *Maser*, 2002). De esta manera, el proceso de tumorigénesis implica una microevolución, en el sentido Darwiniano, que deviene en la transformación de células normales en su contraparte neoplásica. *In vitro*, la transformación celular puede darse en forma espontánea o inducida por agentes físicos, químicos o biológicos y, durante este proceso, las células adquieren características análogas a las de las células transformadas *in vivo* (*Yuan*, 2002; *Cacciotti*, 2001 y 2002).

A pesar de la complejidad implícita en el desarrollo neoplásico, *Hanahan y Weinberg* (2000) han propuesto una serie de características fenotípicas que son comunes a la mayor parte de las células tumorales, independientemente de las alteraciones genéticas particulares subyacentes. Estas son:

1. Autosuficiencia de señales de crecimiento: Las células normales necesitan de señales mitogénicas, que incluyen la presencia de factores de crecimiento y la interacción con otras células y con componentes de la matriz extracelular, para proliferar. Las células tumorales dependen en menor medida de estas señales, ya sea por la secreción autócrina exacerbada de factores de crecimiento, por la alteración de los receptores para estos factores de crecimiento o para componentes de la matriz, o por la modificación de las vías intracelulares de transducción de estas señales. En las células en cultivo, estos cambios se evidencian por el menor requerimiento de suero en el medio de cultivo para proliferar, crecimiento independientemente del anclaje, etc.
2. Insensibilidad a las señales antiproliferativas: En los tejidos normales, existen a su vez

distintos tipos de señales que inhiben la proliferación celular de forma tal de mantener la homeostasis celular. Las células tumorales presentan alteraciones en los receptores para estas señales o bien en las proteínas de señalización “río abajo” de las mismas, por lo que no responden a este mecanismo de control tisular. Esto se refleja a su vez en la desregulación de los mecanismos que conllevan a la diferenciación celular. La unión entre células epiteliales normales adyacentes inhibe la proliferación celular.

En el cultivo *in vitro*, esto se manifiesta por la disminución del crecimiento cuando la monocapa llega a confluencia, proceso denominado “inhibición por contacto”. Las células transformadas muestran una disminución de la inhibición por contacto, por lo que crecen hasta densidades celulares mucho mayores que las células normales.

3. Evasión de la apoptosis: La muerte celular programada (apoptosis) puede ser inducida por diversos tipos de señales proapoptóticas, tanto intra como extracelulares, o por ausencia de señales de supervivencia. El crecimiento de una población celular depende del equilibrio entre las células que proliferan y las que mueren. Las vías de control de la apoptosis están desreguladas en casi todos, sino todos, los tumores humanos. Así, en el cultivo celular *in vitro*, factores que inducen la apoptosis en células normales, como la falta de adhesión a un sustrato, no son o son menos efectivos en las células transformadas.
4. Potencial replicativo ilimitado: La mayor parte de las células normales tienen un potencial proliferativo limitado, dado por el acortamiento de los extremos de los cromosomas en cada replicación del ADN. Las células transformadas sin embargo son inmortales, es decir, pueden proliferar indefinidamente. En la mayor parte de los casos esto se debe a la inducción de la expresión de la enzima telomerasa, que cataliza la adición de nucleótidos en los extremos de los cromosomas.
5. Angiogénesis sostenida: La provisión de oxígeno y nutrientes es esencial para la supervivencia celular. A menos que las células neoplásicas sean capaces de inducir la neovascularización, el tamaño de un tumor estará restringido por la disponibilidad de nutrientes, generándose entonces una presión de selección. Durante la transformación neoplásica, los tumores adquieren la capacidad de promover la angiogénesis, ya sea por la secreción de factores que inducen la neovascularización como por la regulación negativa de la expresión de factores que inhiben la misma.
6. Invasión tisular y metástasis: Las neoplasias malignas se distinguen por su capacidad de invadir los tejidos adyacentes y posteriormente formar metástasis en los tejidos distantes. Durante este proceso, las células tumorales se adhieren a distintos componentes de la matriz extracelular, los degradan y migran a través de la matriz

desorganizada. A su vez, las células deben ingresar en los vasos sanguíneos, extravasarse y crecer en los tejidos distantes.

La adquisición de esta característica está relacionada a modificaciones en las moléculas de adhesión celular y a la sobreexpresión de proteasas extracelulares.

La aparición progresiva de células con ventajas adaptativas está supeditada a la inestabilidad y variabilidad genética que resultan, a su vez, de la supresión de los mecanismos encargados del control y reparación de las mutaciones del ADN en las células transformadas. Esta característica es por tanto una de las más importantes para la progresión del desarrollo neoplásico.

Otro factor que no puede pasarse por alto al considerar el desarrollo neoplásico, y que limita considerablemente la extrapolación de los estudios *in vitro* a las condiciones *in vivo*, es el ambiente. El concepto de selección natural no es concebible sin tomar en cuenta el ambiente, ya que es la relación entre el fenotipo y el ambiente la que determina la eficacia biológica (entendiéndose esta como la capacidad relativa de una entidad que se reproduce de sobrevivir y transmitir sus genes a la siguiente generación, ya sea que se trate de organismos, células, etc. 3). Así, el potencial tumorigénico está profundamente influenciado por el microambiente tisular (*Barcellos-Hoff, 2000; Bhowmick, 2004*).

Objetivos e hipótesis generales del trabajo 4

Como se describió anteriormente, distintos autores han reportado un aumento en la expresión de la SCD en células tumorales. Sin embargo, no se ha investigado cuál puede ser la importancia funcional de la misma o si es simplemente el resultado secundario de la desregulación de otros genes y/o vías metabólicas, sin implicancias para el desarrollo del fenotipo transformado. Por otra parte, algunos de los estudios diseñados con este fin, si bien han provisto de valiosa información, no permiten la vinculación inequívoca de la SCD a los efectos reportados, a la luz de descubrimientos posteriores. Por ejemplo, se ha descrito que el ácido estercúlico, utilizado como inhibidor de la SCD, puede afectar también la actividad de otras desaturasas (*Cao, 1993*). A su vez, la mayor parte de los estudios se realizaron con roedores, y se conoce poco de la relación entre la SCD y el desarrollo neoplásico en humanos.

El objetivo general de nuestro trabajo es el estudio de las funciones potenciales de la SCD humana vinculadas a los eventos de la proliferación y de la muerte celular programada y su relación con el establecimiento de un fenotipo celular transformado.

Hipotetizamos que la actividad de la SCD es fundamental para que la célula tumoral desarrolle su potencial oncogénico debido a la importancia de esta enzima en la síntesis de ácidos grasos necesarios para la formación de fosfolípidos de membrana (esenciales para la

división celular). Adicionalmente, la disminución de la SCD de las células transformadas potenciará la citotoxicidad de los ácidos grasos saturados, que se acumularán en consecuencia, desencadenando la muerte celular programada.

Objetivo 1: Generación de líneas celulares transformadas humanas que presenten una disminución estable en la expresión de la enzima SCD.

Objetivo 2: Estudiar el rol de la SCD en la formación de membranas celulares. Hipótesis: La depleción de la SCD producirá una disminución en la tasa de síntesis de fosfolípidos de membrana debido a la disminución de las especies insaturadas de ácidos grasos, principalmente ácido oleico, y a variaciones en composición de los mismos.

Objetivo 3: Investigar la participación de la SCD en la protección contra la citotoxicidad de los ácidos grasos saturados. Análisis de la intervención de la SCD en eventos de señalización celular mediados por ceramidas.

Hipótesis: El aumento en los niveles de ácidos grasos saturados, producidos por una disminución de la vehiculización de estos hacia sus derivados insaturados, promoverá la muerte celular programada por un aumento de la síntesis de ceramidas.

Objetivo 4: ¿Existe una relación entre el metabolismo de los ácidos grasos, en particular la actividad de la SCD, y el fenotipo celular neoplásico? Análisis de la reversión de parámetros de proliferación, adhesión y tumorigenicidad de células transformadas que subexpresan el gen de la SCD.

Hipótesis: De acuerdo a lo anteriormente expuesto, hipotetizamos que la disminución de la SCD revertirá, al menos parcialmente, el fenotipo celular neoplásico.

Modelos celulares

A pesar de las limitaciones del cultivo celular *in vitro*, en cuanto a su extrapolación a las condiciones *in vivo*, el trabajo con líneas celulares establecidas presenta varias ventajas, en relación a los objetivos de nuestro trabajo. Entre ellas:

- posibilidad de estudio con poblaciones celulares altamente homogéneas
- mayor facilidad de manipulación genética
- mayor control sobre el ambiente en el que se encuentran las células

En este estudio, se utilizó una estrategia de sobreexpresión de cADN de SCD en orientación antisentido para disminuir la expresión de la SCD en dos líneas celulares transformadas humanas. El segmento del cADN de la SCD humana utilizado, cedido gentilmente por el Dr. S. Prouty, al ser empleado para la generación de sondas, hibrida específicamente a los mRNA de esta enzima (*Zhang L, 1999*).

En el presente trabajo se utilizaron las líneas celulares humanas SV40- WI 38 y A549.

La línea SV40-WI 38 proviene de la transformación *in vitro*, con SV40 (*simian virus 40*), de la línea de fibroblastos normales de pulmón humano WI 38 por *A.J. Girardi* en 1966. Si bien este virus puede generar tumores en roedores, la relación entre SV40 y el desarrollo de neoplasias en humanos es todavía discutida (*Jasami, 2001; Gazdar, 2002*).

El mecanismo de transformación por SV40 incluye la inactivación de las proteínas p53 y Rb (proteína del retinoblastoma), por una proteína oncoviral denominada “antígeno tumoral grande” (*Sullivan, 2002*). Las proteínas p53 y Rb inhiben la progresión del ciclo celular, y por tanto son “proteínas supresoras tumorales”. Rb arresta a las células en la fase G1 del ciclo celular, mientras que p53 causa arresto celular e induce apoptosis ante condiciones de estrés (*Harbour, 2000; Evan, 1998*). Las funciones de p53 y Rb se pierden en la mayor parte, sino en todos, los cánceres humanos, ya sea por mutación de los genes que las codifican o de los genes que codifican proteínas necesarias para sus funciones (*Sherr, 2000*).

Además de las alteraciones en el crecimiento celular, las células WI 38 transformadas con SV40 presentan diferencias en el metabolismo lipídico. Estudios previos de nuestro y otros laboratorios mostraron que en la línea SV40-WI 38 la síntesis *de novo* de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol están incrementadas respecto de la línea parental normal (*Howard, 1969; Scaglia, 2005*). A su vez, estas células tienen mayores niveles de expresión y actividad de la SCD respecto de las células normales WI 38, una elevada proporción de ácidos grasos monoinsaturados/saturados en los lípidos celulares y una mayor fluidez en las membranas celulares (*Scaglia, 2005*). Otras de las alteraciones en el metabolismo lipídico de

las células SV40-WI 38 incluyen en incremento en los niveles de diacilglicerol y una disminución en el de ceramidas, respecto de su contraparte normal. Estas alteraciones son concordantes con el incremento en la actividad de la esfingomielina sintasa en estas células transformadas, a pesar de la disminución del contenido de este esfingolípido (*Luberto, 1998*). Se ha reportado a su vez que la utilización del diacilglicerol como segundo mensajero y/o como sustrato para la síntesis de membranas es esencial para mantener el fenotipo celular transformado de esta línea (*Bagnato, 2003*).

Las células A549 provienen de un carcinoma de pulmón humano. Esta línea retiene algunas de las características de las células alveolares de tipo II, de las que derivan, como la capacidad de secretar surfactante (*Lieber, 1976*). Sin embargo, la tasa de síntesis de fosfatidilcolina disaturada, un fosfolípido muy abundante en el surfactante pulmonar, está disminuida (*Spragg, 2000*).

Dado que las células SV40-WI 38 no generan tumores cuando son inoculadas en ratones genéticamente atímicos (*Bagnato et al., observaciones no publicadas*), se utilizó la línea celular A549 para evaluar la relación entre la deficiencia de SCD y la tumorigenicidad *in vivo*.

La elección de esta línea se realizó tomando en cuenta que la actividad de la SCD, estimada a partir del porcentaje de conversión de [14C]ácido esteárico en sus derivados monoinsaturados, es comparable a la de las células SV40-WI 38 (*Scaglia, 2005*).

Materiales y Métodos

1. Materiales

Las células de pulmón humano transformadas con SV40 (SV40-WI 38) se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA) y las células de carcinoma humano A549 fueron cedidas gentilmente por la Dra. Margarita García de Bravo (INIBIOLP, La Plata, Argentina).

Los ratones genéticamente atímicos (*nu/nu*), hembras de 4-6 semanas de edad, pertenecen al stock N:NIH(S)-nu cuyos progenitores proceden del *National Institute of Health* (USA) y fueron criados y producidos en sistema cerrado bajo barreras en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

El fragmento del cADN de la SCD humana correspondiente a los pares de bases 278-2005 (GenbankTM, accesion no. AF097514) fue un generoso obsequio del Dr. Stephen M. Prouty (R. W. Johnson Research Institute, PA, USA) y el Dr. William Samuel (National Institutes of Health, MD, USA).

La LIPOFECTAMINETM, el plásmido pcDNA3, la GeneticinTM, el medio de cultivo y los otros reactivos de cultivo fueron obtenidos de *Invitrogen Life Technologies* (USA). El suero

fetal bovino (FBS) se adquirió en *Gen S.A* (Argentina), mientras que los elementos estériles plásticos para cultivo celular fueron provistos por *Greiner BioOne* (Alemania).

Las enzimas de restricción y otros reactivos de biología molecular, así como el CaspACETM Assay System se compraron a *Promega* (USA).

American Radiolabeled Chemicals, Inc. (USA) proveyó el [1-14C]ácido esteárico y *New England Nuclear* (USA) el [2-3H]glicerol. El resto de los compuestos radioactivos, [1-14C]ácido acético, [1-14C]ácido oleico, [metil-14C]colina, [-32P]ATP, [-32P]-dCTP y [6-3H]timidina, así como el marcador de peso molecular Rainbow, fueron de *Amersham Biosciences* (Inglaterra).

La albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina, los anticuerpos secundarios anti-mouse y anti-rabbit IgG conjugados con peroxidasa, los inhibidores de proteasas y el etopósido fueron adquiridos de *Sigma* (USA). El anticuerpo anti-SCD1 fue cedido gentilmente por el Dr. Omar Rimoldi (INIBIOLP, La Plata, Argentina).

Los estándares lipídicos puros fueron de *Doosan Serdary* (Korea) y *Nu- Check Prep, Inc* (USA). Las placas cromatográficas de Sílica gel 60 fueron de *Merck* (Alemania) y los solventes de grado analítico de *Carlo Erba* (Italia).

La enzima diacilglicerol kinasa de *E. coli* fue provista por *Calbiochem- EMD Biosciences* (USA) y el SuperSignal de *Pierce Biotechnology* (USA). Todos los gases utilizados fueron de *AGA* (Argentina).

2. Cultivo Celular

Las células SV40-WI 38, A549 y las líneas derivadas transfectadas se cultivaron rutinariamente en Medio Esencial Mínimo (MEM) con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado a 56°C durante una hora, NaHCO₃ 26 mM, 100

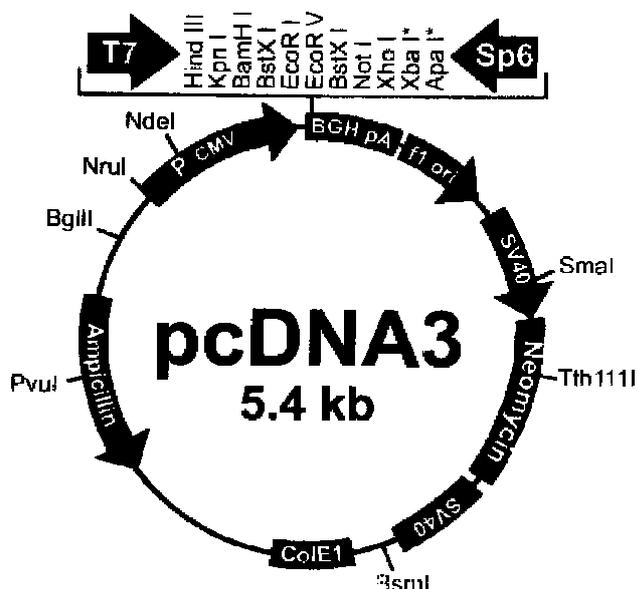
UI/ml Penicilina, 100 g/ml Estreptomina, 1% solución de vitaminas para MEM, 1% Aminoácidos no esenciales (medio de crecimiento), a 37° C, en una atmósfera de 5% CO₂ y 100% de humedad. Para el repique de las células se utilizó Tripsina/EDTA como agente desagregante.

Para las incubaciones de las células con ácidos grasos, los mismos se solubilizaron en MEM con albúmina sérica bovina (BSA) delipidizada en las proporciones indicadas en los respectivos diseños experimentales. En el caso de incubaciones con compuestos radioactivos, el medio de marcación se recobró luego para su cuantificación por conteo de centelleo líquido.

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer. Simultáneamente se estimó la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de Trypan que se basa en la impermeabilidad de las células viables al colorante (*R. Ian Freshney, 2000*)

3. Construcción del vector de expresión pcDNA3-hSCDas

Para la construcción del vector de transfección conteniendo el cADN de la SCD humana (hSCD) en posición antisentido en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3, se utilizó el fragmento del cADN de la SCD, pb 278 (exón 2) a 2005 (3'utr) aislado de una biblioteca de cADN de queratinocito humano, clonado por el Dr. Stephen Prouty en el sitio EcoRI del vector pBluescript II, SK(+). El plásmido pcDNA3 (5.4 kb) presenta el replicón ColE1, que le permite ser replicado en bacterias, junto con el gen de selección *amp^r* que confiere resistencia a la Ampicilina, por lo que las bacterias positivamente transformadas pueden ser seleccionadas. Este plásmido también contiene los promotores derivados de bacteriófagos, T7 y SP6, en ambos extremos del sitio de clonación múltiple, que permiten la transcripción *in vitro* de cualquier gen colocado en el sitio de clonación múltiple. La unidad de transcripción en eucariotas comprende el promotor de citomegalovirus humano, "río arriba" del sitio de clonación múltiple, y una secuencia poli A derivada del gen de la hormona de crecimiento bovina, justo después de la terminación del sitio de clonación múltiple. El marcador de selección eucariota es el gen *neo*, que codifica a la aminoglicósido 3'fosfotransferasa, y confiere resistencia a la Geneticina a las células que lo expresan. Este gen se encuentra bajo el promotor de SV40 y termina en una secuencia poli A derivada del mismo virus. También contiene un origen de replicación SV40 que permite su replicación episomal en eucariotas. A continuación se presenta un esquema del mismo.



Mapa del vector de expresión pcDNA3
(Invitrogen™ Life technologies)

En primera instancia, se transformaron bacterias competentes de la cepa JM109 de E.

coli con el vector de clonación mencionado (pBluescript II, SK (+)- clon21) mediante cloruro de calcio. La técnica se basa en la observación de que el Ca^{+2} induce un estado denominado "de competencia" en el que las bacterias captan ADN foráneo. El protocolo utilizado es una variación del descrito por *Cohen et. al.*, 1972 (*Sambrook, 1989*).

Las colonias transformadas positivamente, crecidas sobre una placa de medio Luria-Bertani (LB)-agar con el antibiótico de selección ampicilina, fueron transferidas a medio líquido LB con ampicilina y crecidas por 12 hs. A continuación se extrajo y purificó el ADN plasmídico mediante la técnica de minipreparación (*Sambrook et. al*, 1989).

Una vez que el plásmido fue chequeado por electroforesis en gel de agarosa (ver más adelante), el inserto se liberó por corte con la enzima de restricción EcoRI.

El procedimiento descrito más arriba se utilizó para amplificar y purificar el plásmido pcDNA3. Tanto el plásmido pcDNA3 como el inserto correspondiente al cADN de hSCD fueron tratados con EcoRI y HindIII de forma tal de generar extremos cohesivos. Después de su purificación del gel de agarosa de bajo punto de fusión y su cuantificación por densitometría por comparación con estándares, el cADN de la hSCD se subclonó en el vector pcDNA3 en posición antisentido bajo el promotor de citomegalovirus humano. El vector de expresión resultante (pcDNA3-hSCDas) se sometió al mismo proceso de amplificación y purificación descrito.

4. Transfección y Selección clonal

El plásmido de expresión pcDNA3-hSCDas y el vector control (pcDNA3 vacío), se introdujeron en las células acomplejados con LipofectAMINE de acuerdo a las instrucciones del fabricante. LipofectAMINE es una mezcla de dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) y 2,3-dioleiloxi-N-(2(espermincarboxiamido)-etil)-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoracetato (DOSPA) que, al igual que otros lípidos catiónicos, puede formar liposomas que interaccionan electrostáticamente con el ADN. Se ha sugerido que los complejos ADN-liposomas se fusionan con la membrana plasmática, o que entran por endocitosis o incluso por fagocitosis (*Scherman et al*, 1998). El tráfico intracelular de estos complejos, así como la entrada del ADN al núcleo celular son poco conocidos. Una vez en el núcleo, el ADN plasmídico puede insertarse en el genoma de la célula huésped o quedar en forma epigénica.

Se generaron líneas establemente transfectadas por selección con 600 g/ml de Geneticina en el medio de cultivo durante 14 días. Para obtener poblaciones homogéneas, se aislaron colonias clonales utilizando cilindros de clonado sellados con grasa siliconada. Para ello, se sembraron placas de cultivo de 100 mm con células a una densidad tal que las células individuales quedan bien separadas unas de otras. Después de la formación de colonias pequeñas estas se marcaron en el petri bajo el microscopio, se tripsinizaron dentro

de los cilindros de clonado y cada una se pasó a una placa de 100 mm. Los clones así obtenidos se denominaron “hSCDas” por SCD humana en posición antisentido, y se agregó una letra arábiga a cada uno de los provenientes de la línea SV40-WI 38, y una letra griega a aquellos de la línea A549. A las células SV40-WI 38 y A549 transfectadas con el vector vacío se las denominó “control”.

5. Ensayos de marcación metabólica

Los compuestos marcados radioactivamente permiten el estudio dinámico de los procesos biológicos. Por otra parte, la sensibilidad de los métodos de detección de los radiotrazadores es mucho mayor que la de la mayoría de los otros procedimientos físicos y químicos, por lo que moléculas poco abundantes pueden ser detectadas.

En nuestros experimentos utilizamos lípidos marcados radioactivamente con ^{14}C o ^3H . En todos los casos, se determinó la radioactividad del medio de marcación antes y después del período de incubación, por conteo de centelleo líquido en un equipo Wallac (modelo 1214 Rackbeta). En cada experimento se midió la incorporación del lípido marcado a los lípidos celulares totales y su distribución en las diferentes especies lipídicas. Tanto la cantidad de cada radiotrazador como el período de incubación con el mismo variaron de experimento a experimento y serán descriptos en los diseños experimentales respectivos.

Las técnicas de separación y análisis de lípidos isotópicamente marcados no difieren en principio de aquellas para lípidos no marcados, por lo que son descriptas en conjunto a continuación.

6. Extracción de lípidos celulares

La extracción de los lípidos celulares se realizó según el método descrito por *Bligh & Dyer*, 1959, con modificaciones. Las monocapas celulares se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) frío de forma tal de eliminar cualquier lípido proveniente del FBS presente en el medio de cultivo. En el caso de las incubaciones con ácidos grasos marcados radioactivamente, se agregó 0.2% de BSA al PBS para remover aquellos ácidos grasos que pudieran quedar adsorbidos a la superficie celular. Las células se rasparon de las placas de cultivo con *scraper* mediante dos adiciones sucesivas de 1 ml de metanol frío, y colocadas en tubos de vidrio con tapa de teflón, en hielo. La mezcla de solventes se completó con el agregado de 1 ml de cloroformo y 0.5 ml de agua bidestilada. Se realizaron dos extracciones consecutivas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sistema de solventes (metanol:cloroformo:agua 2:1:0.5 por vol.) asegura una buena extracción de los lípidos celulares debido a que es lo suficientemente apolar como para que los lípidos se disuelvan en el mismo y, al mismo tiempo, tan polar como para vencer las fuertes fuerzas de asociación entre los lípidos y otros

constituyentes celulares como las proteínas. A continuación se agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua de forma tal de particionar la mezcla y eliminar los posibles contaminantes no lipídicos con la fase acuosa. La fase clorofórmica, que contiene los lípidos purificados, se pasó a tubos limpios y se concentró luego de su evaporación en una centrifuga concentradora. En aquellos experimentos en los que se marcó a los lípidos con algún isótopo radioactivo, se tomó una alícuota para contar la incorporación en la fracción de lípidos totales.

7. Saponificación y Esterificación de ácidos grasos

Muchos lípidos simples y complejos son muy polares o de muy alto peso molecular como para ser sometidos a determinadas técnicas cromatográficas (ver más adelante). Además, en ciertos casos es necesario hidrolizarlos para analizar sus constituyentes.

Los ácidos grasos componentes de los lípidos acilados pueden ser obtenidos por saponificación, proceso durante el cual se produce la hidrólisis de los enlaces éster que los unen. Los lípidos se hidrolizaron en una solución de KOH 10% p/v en etanol bajo atmósfera nitrogenada, a 80°C durante 45 min. Se realizó una partición de la mezcla mediante el agregado de éter de petróleo para remover la fracción insaponificable (con cualquier hidrocarburo, alcohol graso o esteroles presente en la muestra). Los ácidos grasos libres se protonaron con el agregado de HCl y solubilizaron en éter de petróleo luego de una segunda partición.

Para obtener los ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos, estos últimos fueron sometidos a esterificación en BF₃ 10% en metanol, en atmósfera nitrogenada a 64°C durante 3 hs.

En el caso de partir de especies lipídicas puras (por ejemplo, aisladas después de una TLC preparativa), los ésteres metílicos de sus ácidos grasos se obtuvieron por transesterificación.

8. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica simple para separar lípidos de acuerdo a su afinidad relativa por un adsorbente sólido polar (fase estacionaria) y un sistema de solventes (fase móvil). Tanto el adsorbente como el sistema de solventes utilizados son escogidos de acuerdo al tipo de lípidos que se desea separar.

- Lípidos neutros: Los distintos lípidos neutros se separaron de la fracción de lípidos polares totales mediante el sistema de solventes hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:2, por vol.).

- Fosfolípidos: El sistema de solventes utilizado para la separación de fosfolípidos fue cloroformo:metanol:hidróxido de amonio:agua (50:37.5:3.5:2 por vol.).
- Ésteres metílicos de ácidos grasos: Los ácidos grasos pueden separarse de acuerdo al número y configuración de sus dobles enlaces en una TLC impregnada con AgNO₃ 10% p/v en acetonitrilo. La plata forma complejos polares reversibles con los electrones de los enlaces de las cadenas acilo, por lo que los ácidos grasos más insaturados son retenidos en por el adsorbente en mayor medida. El sistema de solventes utilizado para separar los ésteres metílicos derivados de ácidos grasos monoinsaturados de aquellos derivados de ácidos grasos saturados fue hexano:éter etílico (90:10 por vol.).
- Ceramidas: La ceramida-fosfato y el ácido fosfatídico, productos de la diacilglicerol-kinasa (ver más adelante), se resolvieron por TLC con una mezcla 10:4:3:2:1 por vol. de cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua (*Luberto et al., 1998*).

En todos los casos, las cromatografías se realizaron de modo unidireccional.

La detección e identificación de las especies lipídicas se realizó por tinción con vapores de yodo y comparación con una mezcla de estándares puros corridos en paralelo, excepto en aquellas muestras en las que los lípidos debían luego ser sometidos a cromatografía gas-líquido. En este caso se expusieron al yodo inicialmente sólo las calles con los estándares y, después del raspado de los lípidos, se expuso toda la placa a fin de corroborar la correcta extracción de los mismos. Los fosfolípidos se extrajeron de la sílica gel con cloroformo:metanol:agua (5:5:1 por vol.) y los lípidos neutros con metanol:cloroformo:hexano (1:1:2 por vol.).

Los lípidos marcados con ¹⁴C o ³H se detectaron sobre la cromatoplaça con un escáner de barrido radiométrico, mientras que para aquellos marcados con ³²P se utilizó un detector PhosphorImager (Molecular Dynamics). Posteriormente los lípidos se rasparon de la sílica gel y su radioactividad determinada en un contador de centelleo líquido.

9. Cromatografía gas-líquida

Con la cromatografía gas-líquida capilar (GLC), los distintos lípidos de una muestra son volatilizados y arrastrados por una corriente de gas inerte a través de una columna que contiene un líquido de alto punto de ebullición. Las moléculas son separadas de acuerdo a

sus coeficientes de partición, que dependen de su volatilidad y su solubilidad en la fase líquida estacionaria.

Esta técnica es muy útil para analizar lípidos complejos ya que, con el agregado de un estándar interno de masa conocida ausente en la muestra original (generalmente un ácido graso de cadena impar), se pueden determinar tanto la composición de sus ácidos grasos como su masa. Para ello, se obtienen sus ácidos grasos constituyentes y se los transforma en derivados más volátiles, como ésteres metílicos.

En nuestros experimentos, los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos de los lípidos celulares totales o de especies lipídicas separadas por TLC preparativa como se describió anteriormente, fueron analizados por GLC. Para ello se utilizó un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama sobre una columna capilar con fase fija OMEGA WAX 250 (Sulpeco, Bellefonte, PA) de 30 m x 0.25 ID; 0.25 mm film a una temperatura inicial de 175°C por 3 min., una rampa de 3°C/min y una temperatura final de 230°C durante 20 min. El detector se mantuvo a una temperatura levemente mayor que la alcanzada por la columna (250°C) para evitar cambios en la respuesta del mismo durante la programación de la temperatura.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención relativos al 18:0, utilizando como estándar una mezcla comercial de ésteres metílicos de ácidos grasos puros.

10. Medición de proteínas

Una forma de estimar la masa celular en un cultivo es midiendo la cantidad de proteínas, y así se puede estandarizar una determinación. Para la mayor parte de los experimentos, se cultivaron células en paralelo en iguales condiciones para la determinación de interés y para medición de proteínas, excepto en experimentos que comprendieran marcación radioactiva en los que no se agregó la misma a las células destinadas a proteínas. Las monocapas celulares se colectaron con agua bidestilada y mantenidas a -20°C hasta su utilización. Una vez descongeladas las muestras, se homogeneizaron mediante sonicación y el contenido de proteínas celulares se determinó por el método de *Lowry et al*, 1951, que se basa en la reducción del reactivo de Folin por las proteínas tratadas con cobre, utilizando BSA como estándar. Se determinó el contenido proteico de dos alícuotas de cada muestra, con duplicados para cada tratamiento, a partir de la ecuación de la curva de calibración de seis puntos.

11. Electroforesis

La electroforesis permite la separación de moléculas de acuerdo a su masa, forma y carga, al ser sometidas a un campo eléctrico.

-Proteínas: Las proteínas pueden separarse de acuerdo a su masa relativa por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Utilizamos SDS-PAGE seguidas de Western blot (ver más adelante) para estimar el nivel de SCD. Las células, removidas de las placas de cultivo por tripsinización, se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en 250 l de buffer Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, 2% v/v cocktail de Inhibidores de proteasas y se congeló a -80°C inmediatamente. Al momento de la determinación, la suspensión se sonicó en baño de hielo y se determinó su contenido proteico como se describió anteriormente. Cien microgramos de proteínas celulares totales desnaturizadas a 100°C con SDS y - mercaptoetanol, se separaron en geles de 12.5% de poliacrilamida a 100 V, con buffer Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v. El estándar de peso molecular Rainbow Marker se corrió en paralelo.

-Ácidos nucleicos: Las moléculas de ADN obtenidas como se describió, se separaron por electroforesis en geles submarinos de agarosa (0.8-1% p/v), con buffer TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM), preteñidos con bromuro de etidio. Se determinó su peso molecular y masa por comparación con los estándares Marker EcoRI/HindIII y High DNA Mass Ladder. El ARN total celular se aisló con el kit comercial "SV total RNA isolation system" (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN obtenido se determinó por espectrofotometría a 260 nm en alícuotas por duplicado de cada muestra. El ARN de las muestras se secó en centrifuga concentradora y se mantuvo a -80°C hasta su uso. Veinte microgramos de ARN total celular, desnaturizado a 65°C con formaldehído, se separaron mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa-formaldehído a 50 V en buffer MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7).

12. Western blot

La técnica de Western blot implica la transferencia e inmovilización de proteínas, separadas por electroforesis en gel, a un soporte sólido (como una membrana de nitrocelulosa) seguida de la detección inmunológica de la proteína de interés.

Las proteínas celulares separadas por SDS-PAGE como se describió anteriormente, fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa, previa remoción del SDS del gel, con buffer Towbin (Tris 25mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% v/v). A continuación las membranas se bloquearon durante 12 hs con 5% leche descremada en PBS-5% Tween 20 (PBST). Los anticuerpos primarios utilizados fueron de conejo anti-SCD1 de rata 1:500 e IgG de ratón anti--actina 1:5000 ambos en 2% leche descremada-PBST.

Empleamos anticuerpos secundarios de cabra anti- IgG de conejo y ratón respectivamente, 1:10000 en 2% leche descremada-PBST, conjugados con peroxidasa de rábano. La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia, usando el reactivo SuperSignal, Pierce (que contiene luminol y H₂O₂) como sustrato de la peroxidasa de rábano. La luz emitida se captó por medio de películas radiográficas en cassette Kodak con amplificadores de señal y se cuantificó por densitometría utilizando el programa Kodak Digital System. La señal correspondiente a SCD se estandarizó a la de -actina.

13. Northern blot

Con la técnica de hibridación Northern (o RNA blotting), pueden determinarse tanto el tamaño como la cantidad de una molécula específica de ARN. Después de su separación por tamaño por electroforesis desnaturizante en gel de agarosa, las moléculas de ARN se transfieren a un soporte sólido (como una membrana de nitrocelulosa o nylon). El ARN de interés puede ser entonces identificado por hibridación con una sonda de ADN o ARN marcada radioactivamente, seguida de autorradiografía u otro método de detección.

Para la detección del ARN de la SCD humana en las células hSCDas y controles, realizamos una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, como se describió anteriormente. Después de la remoción del formaldehído del gel, mediante lavados con agua estéril y 10X SSC (NaCl 1.5 M, citrato de sodio 150 mM), el ARN se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond, Amersham) por elución capilar, con buffer SSC 10X durante 12 hs. A continuación la membrana se irradió con luz ultravioleta de forma tal de que una fracción de las bases nitrogenadas del ARN formen enlaces cruzados con los grupos amino de la membrana, inmovilizándose de esta forma el ARN en la superficie de la misma. Para evitar la unión inespecífica de la sonda radioactiva a la superficie de la membrana, se realiza una prehibridación de la misma con una solución compuesta por 120 mM NaPO₄ pH 7.2, 250 mM NaCl, 7% p/v SDS, 1 mM EDTA pH 8, 5X reactivo de Denhardt (0.1% Ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona, 0.1% BSA fracción V), 50% v/v formamida. Como sondas se utilizaron ADN de cadena simple sintetizados *in vitro* con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, mediante el kit comercial "Prime a gene labeling system" (Promega) con cebadores de secuencia aleatoria (random primers) y [-32P]-dCTP (3000 Ci / mmol). Los templados usados fueron el segmento del cADN de la SCD humana ya descrito y el cADN de la -actina de rata, ambos desnaturizados a 100°C por 3 min. Las sondas se purificaron mediante el sistema "Wizard DNA clean-up system" (Promega). La hibridación de la sonda para SCD desnaturizada con su ARN complementario unido a la membrana, se realizó con la misma solución de prehibridación, con ADN desnaturizado de salmón, como agente bloqueante. Se dejó proseguir la hibridación a 45°C durante 12 hs y, luego de varios lavados con concentraciones de crecientes de SSC y 0.1% SDS, se

detectaron y cuantificaron las bandas sobre la membrana por medio de un phosphorImager y análisis densitométrico con el programa Kodak Digital System. La sonda para SCD fue entonces removida por incubación a 100°C durante 30 min. con una solución de 0.01%SSC y 0.5%SDS. Posteriormente se realizó el procedimiento ya descripto para la hibridación con la sonda para -actina (control de sembrado). La señal correspondiente a SCD se estandarizó a la de -actina. Todo el material utilizado para trabajar con ARN se trató con 0.1% dietilpircarbonato (DEPC) previo su uso y las soluciones se prepararon con DEPC-agua y se esterilizaron por autoclavado o filtración.

14. Análisis de apoptosis 1: Fragmentación del ADN

El protocolo descripto por *Venable et al*, 1995, saca provecho de una característica de las células apoptóticas, la fragmentación del ADN, para estimar el nivel de apoptosis de una población celular (*Thornberry*, 1998).

En nuestros experimentos, se incubaron monocapas celulares preconfluentes con 0.4 Ci [3H]timidina durante 24 hs. Pasado este período de marcación, las monocapas se lavaron con PBS y se dejaron otras 24 hs creciendo en medio de crecimiento o MEM suplementado o no con ácidos grasos en las concentraciones indicadas. Se incluyó un grupo de células tratadas con el agente proapoptótico etopósido (40 M) durante 24 hs como control positivo. El medio condicionado se recuperó y las células se removieron del petri y se lisaron con 1% Tritón-X 100, 0.2% EDTA en PBS. A continuación, los lisados celulares se centrifugaron a 14000 r.p.m. con lo que se obtuvo un sobrenadante (con los fragmentos de ADN pequeños) y un precipitado (con las moléculas mayores de ADN). Se separó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en la solución de lisis. Después del conteo por centelleo líquido de todas las fracciones, se estimó el porcentaje de apoptosis sumando las DPM del medio de incubación y las del sobrenadante y dividiéndolas por las DPM totales

15. Análisis de apoptosis 2: Morfología nuclear

La condensación de la cromatina en cuerpos densos es otra característica de las células apoptóticas (*Thornberry*, 1998). El siguiente protocolo, utilizado para evaluar esta variable, es una modificación del descripto por *Kasai et al*, 1998.

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos hasta llegar a 50% de confluencia. Luego de un lavado con PBS se fijaron con 1% glutaraldehído en PBS durante 30 min. en frío. Se removió el glutaraldehído y se lavó el remanente con PBS. Después de la tinción con 10 M Hoestch 33258 durante 10 min., las células se observaron y fotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus) con excitación a 360 nm. Las células con núcleos condensados o fragmentados fueron consideradas apoptóticas. Se incluyó un grupo de

células tratadas con el agente proapoptótico etopósido (40 M) durante 24 hs como control positivo.

16. Análisis de apoptosis 3: Actividad de caspasa-3

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas, encargadas del clivaje de numerosas proteínas tanto reguladoras como estructurales durante la apoptosis celular (Thornberry, 1998).

Se utilizó el kit comercial Caspace™ Assay System (Promega) para estimar la actividad de caspasa-3 en nuestro modelo experimental, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La caspasa-3 cliva específicamente en el extremo C-terminal del residuo aspartato dentro de la secuencia Asp-Glu-Val- Asp (DEVD). El kit provee de un sustrato (Ac-DEVD-pNA) que, al ser escindido por la acción de la caspasa-3 en la secuencia DEVD, libera el cromóforo p- nitroanilina (pNA). La cantidad de color producida, monitoreada por un fotómetro a 405 nm, es proporcional a la actividad *DEVDasa* presente en la muestra. Se utilizaron 100 g de proteínas celulares totales y una curva de calibración de pNA con seis puntos cuyo R² fue mayor a 0.95. Se incluyó un grupo de células tratadas con el agente proapoptótico etopósido (40 M) durante 24 hs como control positivo.

17. Cuantificación de ceramidas: Ensayo de Diacilglicerol kinasa

La enzima Diacilglicerol kinasa (DAGK) fosforila diacilglicerol y ceramida produciendo ácido fosfatídico y ceramida-fosfato, respectivamente. De esta forma, utilizando [-32P]ATP como cosustrato de la reacción *in vitro* se obtienen los productos marcados radioactivamente y se puede estimar el contenido de ceramidas de la muestra. Seguimos el protocolo descrito por Preiss *et al*, 1986 con modificaciones de Luberto *et al*, 1998.

Resumidamente, células preconfluentes fueron tripsinizadas; una alícuota de cada muestra fue separada para determinación del contenido proteico y el resto fue utilizado para la extracción del contenido lipídico, como se describió. Los lípidos anteriormente evaporados correspondientes a 500 g de proteínas celulares se solubilizaron en 7.5% octil- -D-glucósido 5 mM cardiolipinas en agua, por sonicación a 40 Hz durante 15 seg., seguida por una incubación de 10 min. a temperatura ambiente. Se agregó a continuación el buffer de reacción 2X (100 mM imidazol HCl pH6.6, 100 mM NaCl, 25 mM MgCl₂ y 2 mM EGTA), 100 mM ditiotreitól y DAGK de *E. coli* (1.3 x 10⁻³ U), completándose con agua el volumen de reacción. La reacción se inició con el agregado de 1 Ci [-32P] ATP en 2 mM ATP no radioactivo preparado en imidazol 100 mM pH 6.6, se dejó proseguir durante 30 min. a 25°C y se terminó con el agregado de metanol:cloroformo (2:1 por vol.). La extracción de los lípidos se continuó según fuera descrito. Se procesaron, en paralelo, 80 g de C2-ceramida

(estándar) y un tubo con todos los reactivos excepto los lípidos celulares (blanco de reacción). Los productos lipídicos de la reacción, se separaron por TLC como se describió anteriormente, se detectaron con un phosphorImager, y su radioactividad se determinó por centelleo líquido después de su raspado de la sílica gel.

18. Análisis de proliferación celular 1: Incorporación de [3H] timidina

El crecimiento celular puede estimarse incubando las células con timidina marcada radioactivamente por un corto período de tiempo, y contando luego la cantidad del trazador incorporado al ADN celular.

La incorporación de [3H]timidina al ADN celular se determinó según el protocolo descrito por *Ogretmen et al*, 2001. Resumidamente, células preconfluentes se incubaron durante 2 hs con 1 Ci [3H]timidina en el medio de crecimiento. Después de dos lavados con PBS frío, el ADN celular se precipitó con una solución de 0.5% ácido tricloroacético durante 20 min. en hielo. El precipitado se lavó con etanol absoluto y se disolvió con una solución 0.1 M NaOH, 2% Na₂CO₃. Una alícuota se neutralizó con HCl y se contó su radioactividad en un contador de centelleo líquido. La marcación total se normalizó al contenido proteico de células cultivadas en paralelo.

En algunos experimentos las células se cultivaron con ácido oleico 100 M durante 72 hs o 200 M por 4 semanas, antes de la incubación con [3H]timidina.

19. Análisis de proliferación celular 2: Curva de crecimiento

Otra forma de estimar el crecimiento celular es mediante curvas de crecimiento. Estas curvas permiten analizar la cinética de la población celular bajo determinadas condiciones, por ejemplo, la duración de las fases “lag”, de crecimiento exponencial (“fase log”) y estacionaria, y determinar parámetros como el tiempo de duplicación poblacional.

Se sembraron 1.6×10^5 células en petris de 60 mm. Cada 48 hs se cambió el medio de crecimiento. A distintos intervalos de tiempo, hasta 144 hs, las células fueron tripsinizadas y contadas en cámara de Neubauer. En todo momento la viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Trypan blue.

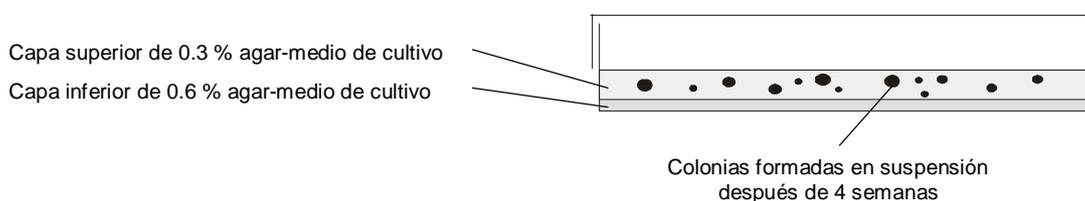
20. Análisis del crecimiento celular independiente de anclaje

Muchas de las características asociadas a la transformación celular *in vitro*, se deben a modificaciones de la superficie celular. La pérdida o alteración de proteínas de adhesión celular puede contribuir al menor requerimiento de un sustrato sólido de las células transformadas para proliferar (*Yang*, 1998; *Lindberg*, 2002). El ensayo de clonación en agar

blando permite evaluar la capacidad de crecimiento celular independiente del anclaje (*Freshney, 2000*).

Para este ensayo se agregó medio de crecimiento con 0.6% p/v agar a los petris de cultivo y se dejó gelificar a temperatura ambiente. A continuación se sembraron 1×10^4 células por petri resuspendidas en medio de crecimiento con 0.3% p/v agar sobre una capa anterior y se dejó gelificar nuevamente. Después de cuatro semanas se observó el crecimiento de colonias multicelulares (más de ocho células) bajo el microscopio. Para la visualización macroscópica, las colonias celulares se tiñeron con bromuro de etidio en PBS y se fotografiaron bajo la luz UV. En algunos experimentos ambas capas de agar-medio se suplementaron con 200 M de ácido oleico.

A continuación se esquematiza el crecimiento celular en suspensión (tomado de *Freshney, 2000*).



21. Mantenimiento de los animales

Para el análisis de tumorigenicidad se utilizaron ratones genéticamente atímicos (*nu/nu*), hembras, de 4-6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron a 25°C con un ciclo luz/oscuridad 12/12 hs en un ambiente con presión positiva y aire filtrado mediante un “filtro de partículas de alta eficiencia” (HEPA).

Tanto las cajas utilizadas para albergarlos (microaisladores), como las botellas de bebida se cambiaron y esterilizaron por autoclavado semanalmente. Se utilizó viruta de pino como material de cama. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio para roedores (Ratón-Ratas, Cargill-Grupo Pilar S.A) esterilizada por radiación gamma con una dosis de 25 kilo Gray (IONICS, El Talar de Pacheco, Buenos Aires, Argentina). Se les permitió asimismo libre acceso al consumo de agua acidulada (pH 3).

22. Análisis de tumorigenicidad

Debido a su condición atímica, la inmunidad celular está severamente comprometida en los ratones *nude*, lo cual los hace prácticamente incapaces de rechazar heterotransplantes (*Manning, 1973*). Esta característica permite la utilización de los ratones *nude* para el estudio de tumores humanos transplantados (*Houchens y Ovejera, 1978*).

En este trabajo se utilizaron las células A549 control y hSCDas- , obtenidas por transfección estable, como se describió previamente, para el estudio de tumorigenicidad. Después de un período de aclimatación de 15 días, los animales fueron inoculados subepidérmicamente en el espacio interescapular con 1×10^6 o 1.6×10^6 células/ratón, resuspendidas en 0.1 ml PBS o MEM libre de FBS. A partir del momento en que los tumores fueron palpables, estos se midieron semanalmente con un calibre y su volumen se calculó con la fórmula de un elipsoide: $V = a^2 \times b / 2$, donde a es el ancho del tumor y b es la longitud, en milímetros. El tamaño de los tumores se relativizó al tamaño inicial por la fórmula V_i / V_0 , donde V_i es el volumen del tumor al tiempo i y V_0 es el volumen inicial del tumor (Houchens, 1978). También se pesó a los animales semanalmente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño $\sim 3000 \text{ mm}^3$ los animales fueron sacrificados de forma tal de evitar el disconfort de los mismos.

23. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en triplicados o cuádruplicados, a menos que se especifique otra cosa. Los resultados se expresaron como media desvío estándar y la significación estadística de los datos se determinó por el test t de Student o ANOVA seguida de Bonferroni t-test.

Resultados

1. Subexpresión estable del gen de la Esteroil-CoA Desaturasa: Modelo celular SV40-WI 38

Tanto la actividad como el nivel de la SCD están aumentados en las células SV40-WI 38 respecto de la línea normal, WI 38 (Scaglia, 2005). Concomitantemente, los niveles de

MUFAs están incrementados en estas células transformadas, sugiriendo que la SCD es la enzima que controla los niveles de MUFAs celulares. El primer objetivo del trabajo fue lograr la disminución de la expresión de la SCD y evaluar si el cambio en la actividad de esta enzima se traducía efectivamente en una variación del perfil de ácidos grasos celulares en este modelo experimental.

Hipótesis: La disminución de la expresión de la SCD, por medio de una estrategia antisentido, reducirá los niveles de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en las células SV40-WI 38.

Diseño experimental: Se seleccionaron varias poblaciones clonales del *pool* de células transfectadas establemente con el cADN de la SCD en posición antisentido. A fin de evaluar la actividad de la SCD en estas colonias clonales, denominados hSCDas-A, -C y -F, y en la línea control (transfectadas con el vector pcDNA3 sin inserto), se incubó a las células con 0.25 Ci/petri de [14C] ácido esteárico (2.3 M) en el medio de crecimiento suplementado con 0.5% BSA, como vehículo del ácido graso, durante 6 hs. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos provenientes de los lípidos celulares totales, obtenidos como se describió en *materiales y métodos*, se resolvieron cromatográficamente sobre una placa fina impregnada con nitrato de plata. Los SFA y MUFA, detectados por escaneo radiométrico e identificados por comparación con estándares corridos en paralelo, se rasparon de la cromatoplaque y su radioactividad se determinó por contador de centelleo líquido. Los picomoles de [14C] ácido oleico producidos por la SCD, que representan la mayor parte de los [14C] MUFA ya que estas células no tienen cantidades apreciables del producto de elongación del ácido oleico (*Scaglia, 2005*), se calcularon a partir de la actividad específica del ácido esteárico sustrato y se estandarizaron a la cantidad de proteínas celulares totales de grupos de células cultivadas en paralelo.

La expresión y el contenido de SCD se determinaron por Northern Blot y Western Blot, respectivamente, como se describió en *materiales y métodos* en diferentes clones hSCDas.

Para evaluar el perfil de ácidos grasos celulares se realizó cromatografía gas-líquido capilar de los ésteres metílicos de ácidos grasos provenientes de los lípidos celulares totales o de los fosfolípidos totales de diferentes clones y células controles

Resultados: Como se muestra en la Figura 1, la actividad SCD se redujo en los tres clones celulares hSCDas analizados, aunque en diferente medida. Las células hSCDas-A presentaron la mayor disminución en la actividad SCD respecto de los controles (~70%) mientras que en las líneas celulares hSCDas- F y -C, se redujo un ~50% y 44%, respectivamente. Debido a que podrían existir variaciones entre experimentos independientes, por ejemplo, con diferentes lotes de FBS en el medio de cultivo (*Kasturi, 1982*), se analizó la actividad de SCD en paralelo en las células controles y las distintas líneas hSCDas bajo condiciones experimentales idénticas.

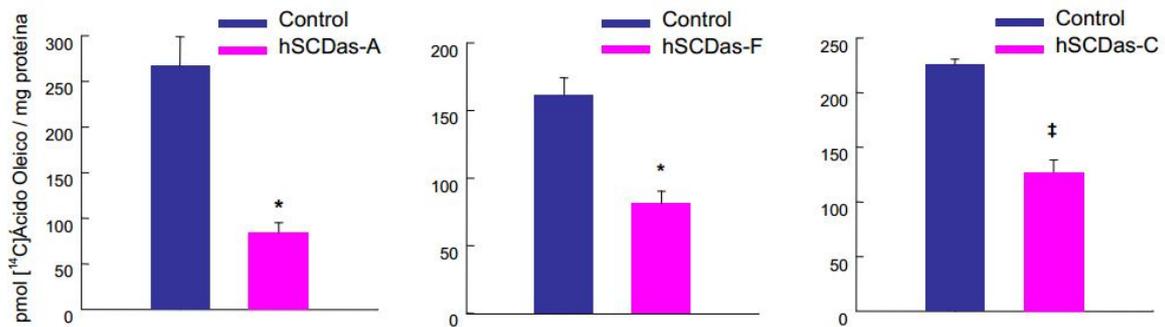


Figura 1: Actividad SCD en células SV40-WI 38 hSCDas y controles. Células preconfluentes se incubaron con [¹⁴C]ácido esteárico durante 6 hs, Los ésteres metílicos de los ácidos grasos derivados de los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC impregnada con nitrato de plata, y su radioactividad se determinó por conteo de centelleo líquido. Los valores representan la media ± SD de triplicados. * p< 0.001, ‡ p< 0.01, t-test.

Las células hSCDas-A exhibieron la mayor reducción de la actividad SCD, por lo que se decidió utilizar esta línea celular para la mayor parte de los experimentos subsiguientes.

Habiendo observado que la actividad de SCD se vio alterada en las células que expresan el cADN antisentido para SCD respecto de aquellas células transfectadas con el mismo vector sin inserto, se procedió a determinar si los niveles de enzima SCD estaban consecuentemente deprimidos. Así, el nivel de SCD, estimado por Western Blot, disminuyó significativamente en las células hSCDas-A respecto de la línea transfectada con el vector vacío (Figura 2), lo cual indica que los cambios observados en la actividad de la SCD se deben a una depleción de los niveles de esta proteína.

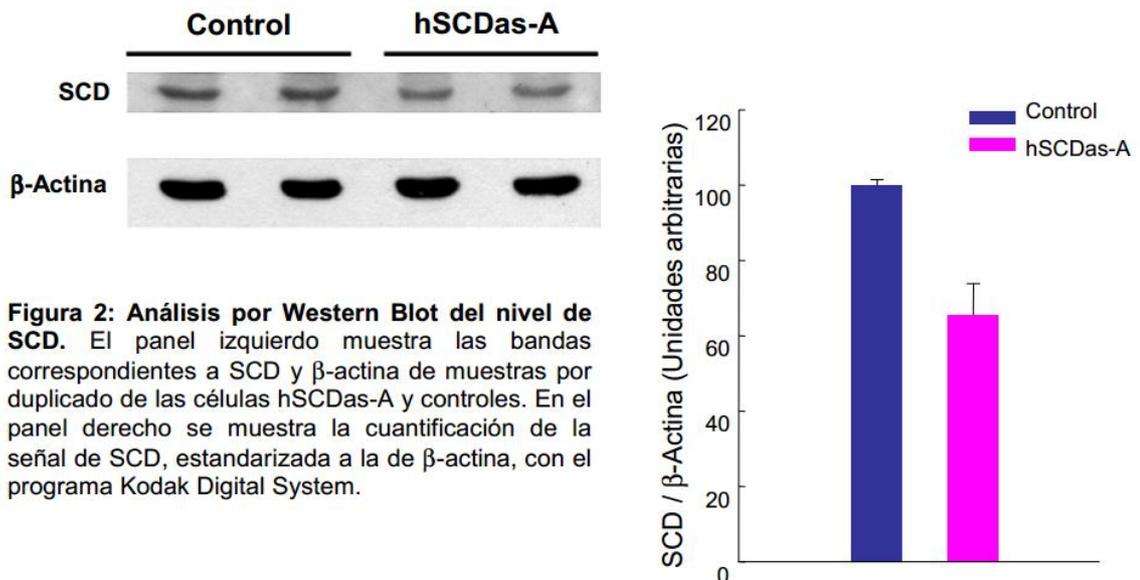


Figura 2: Análisis por Western Blot del nivel de SCD. El panel izquierdo muestra las bandas correspondientes a SCD y β-actina de muestras por duplicado de las células hSCDas-A y controles. En el panel derecho se muestra la cuantificación de la señal de SCD, estandarizada a la de β-actina, con el programa Kodak Digital System.

Para evaluar si la deficiencia en SCD se correspondía con una reducción en el contenido de MUFAs, analizamos el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos totales de las células hSCDas-A y controles, que representan ~70% de los lípidos acilados celulares (Howard, 1969). Como se esperaba, los MUFA disminuyeron significativamente en las células hSCDas-A en comparación con las células transfectadas con el vector vacío (Tabla 1). El ácido palmítico (16:0) se redujo en un 56% mientras que los ácidos oleico (18:1 n-9) y *cis*- vaccénico (18:1 n-7) disminuyeron un 14% y 23%, respectivamente, respecto de las células controles. El ácido esteárico (18:0) se incrementó un 43% en las células deficientes en SCD respecto de los controles mientras que el ácido palmítico (16:0), otro componente mayoritario de los lípidos celulares, no mostró variaciones entre ambas líneas. Concomitantemente, el índice de desaturación MUFA/SFA, el cual expresa indirectamente el grado de actividad de SCD celular, disminuyó un ~31% en la línea hSCDas-A. Este desbalance en los porcentajes de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados alteró el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), 18:2 n-6 y 20:4 n-6, que se incrementaron significativamente en las células hSCDas-A respecto del grupo celular control. Al analizar el perfil de ácidos grasos de las principales especies de fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, los cambios en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados fueron similares a los de los fosfolípidos totales (*datos no mostrados*).

Ácidos grasos (%)	Control		hSCDas -A	
16:0	23.51	0.59	24.45	2.18
16:1 n-7	4.77	0.20	2.10	0.17*
18:0	13.21	1.18	19.00	1.23‡
18:1 n-9	38.02	0.63	32.88	0.78*
18:1 n-7	11.25	0.05	8.69	0.20*
18:2 n-6	4.38	0.05	6.62	0.15*
X	2.03	0.08	2.46	0.42
20:4 n-6	2.84	0.07	3.80	0.22‡
16:1/16:0	0.20	0.01	0.09	0.001*
16:1 + 18:1 n-7/ 16:0	0.68	0.01	0.44	0.04*
18:1 n-9/18:0	2.90	0.28	1.74	0.11‡
MUFA/SFA	1.47	0.06	1.01	0.04*

Tabla 1: Distribución porcentual de los ácidos grasos de los fosfolípidos totales en las células hSCDas-A y controles. Los lípidos celulares se separaron por TLC, los fosfolípidos totales se extrajeron de la sílicagel y los ésteres metílicos derivados de sus ácidos grasos constituyentes se analizaron por GLC. Los valores representan la media \pm SD de triplicados. X, ácido graso no identificado. * $p < 0.001$, ‡ $p < 0.01$, *t*-test

Para determinar si las alteraciones observadas en las células hSCDas-A se debieron específicamente a la depleción de la enzima SCD, se evaluaron la expresión y el contenido de SCD en una población clonal independiente establemente transfectada con el cADN antisentido para SCD. En esta línea celular, denominada hSCDas-C, se había observado previamente una disminución en la actividad 9-desaturasa más leve que en las otras colonias celulares (Figura 1). Así, en el análisis del contenido de ARN mensajero mediante la técnica de Northern Blot, se evidenciaron los dos transcritos típicos de la SCD (Zhang, 1999). El transcripto de mayor peso molecular disminuyó ~50% en las células hSCDas-C respecto de las células controles, mientras que el transcripto de menor peso molecular no mostró diferencias entre ambas líneas (Figura 3A). El análisis por Western Blot de SCD celular evidenció una disminución del ~20% en el nivel de la enzima en el clon C respecto de las controles (Figura 3B).

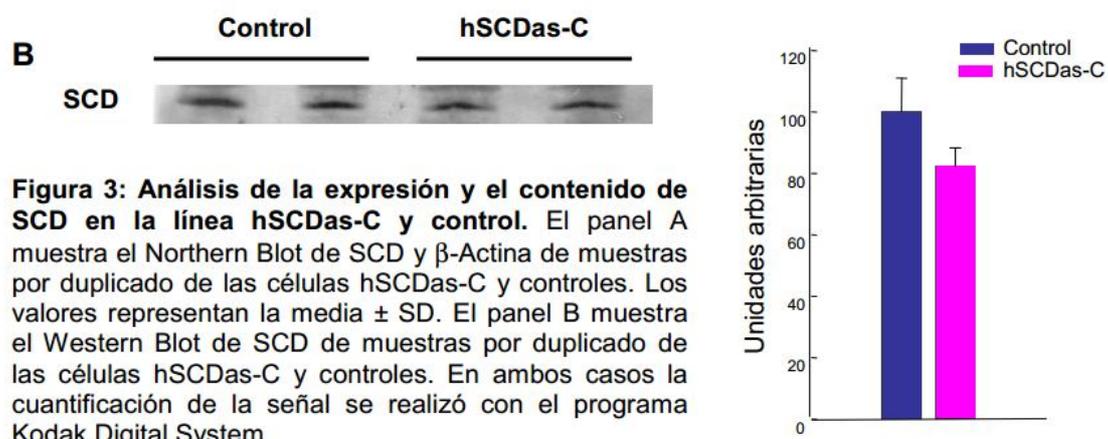
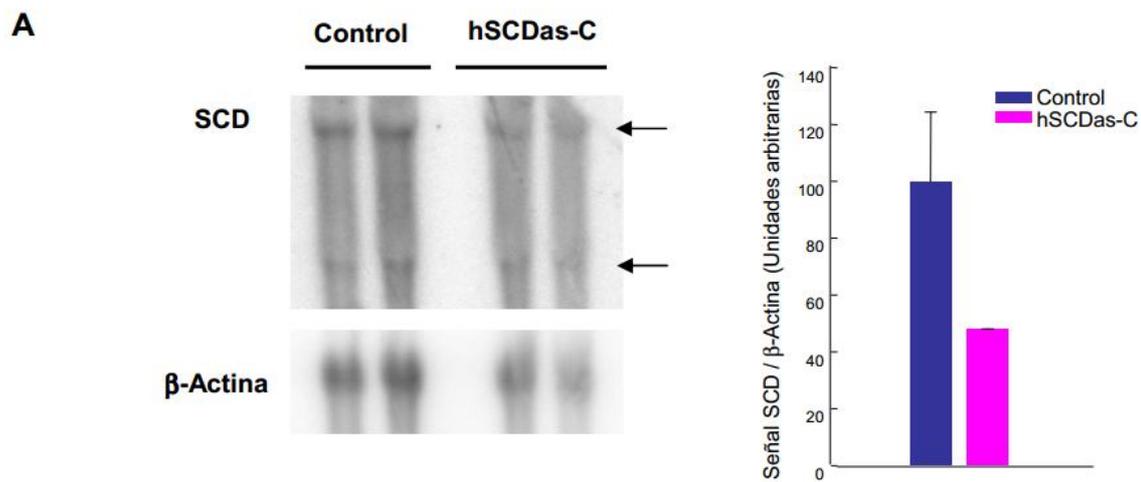


Figura 3: Análisis de la expresión y el contenido de SCD en la línea hSCDas-C y control. El panel A muestra el Northern Blot de SCD y β -Actina de muestras por duplicado de las células hSCDas-C y controles. Los valores representan la media \pm SD. El panel B muestra el Western Blot de SCD de muestras por duplicado de las células hSCDas-C y controles. En ambos casos la cuantificación de la señal se realizó con el programa Kodak Digital System

El perfil de ácidos grasos celulares totales de las células hSCDas-C mostró cambios similares a los del clon hSCDas-A, aunque de diferente magnitud (Tabla 2). Los ácidos grasos oleico y *cis*-vaccénico disminuyeron en un ~6 y 25%, respectivamente, respecto del grupo control. Sin embargo, y a diferencia de las células hSCDas-A, el ácido palmítoleico no mostró cambios significativos entre ambas líneas. Asimismo, el ácido esteárico aumentó un ~20% en la línea celular hSCDas-C, mientras que el porcentaje de ácido palmítico se mantuvo sin variaciones. Consecuentemente, el índice de desaturación disminuyó aproximadamente 20%. Finalmente, los PUFA aumentaron entre 16 y 38% en la línea deficiente en SCD respecto de la cepa control.

Ácidos grasos (%)	Control		hSCDas-C	
16:0	24.66	1.71	24.90	0.48
16:1 n-7	5.69	0.90	4.52	0.29

18:0	15.57	0.59	18.77	0.25‡
18:1 n-9	32.75	1.12	30.70	0.54†
18:1 n-7	10.12	0.43	7.60	0.17‡
18:2 n-6	6.30	0.10	7.35	0.31‡
20:4 n-6	3.57	0.33	4.29	0.28†
22:6 n-3	1.35	0.21	1.86	0.20†
16:1/16:0	0.23	0.02	0.18	0.01†
16:1 + 18:1 n-7/ 16:0	0.64	0.03	0.49	0.01‡
18:1 n-9/18:0	2.10	0.03	1.64	0.04‡
MUFA/SFA	1.21	0.05	0.98	0.02‡

Tabla 2: Distribución porcentual de los ácidos grasos de los lípidos totales en las células hSCDas-C y controles. Los ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos de los lípidos celulares totales se analizaron por GLC. Los valores representan la media \pm SD de triplicados. ‡ $p < 0.01$, † $p < 0.05$, *t*-test

En conjunto, estos datos indican que la transfección estable del cADN de la SCD en posición antisentido promovió una efectiva disminución de la expresión y actividad de la 9-desaturasa en diferentes poblaciones clonales seleccionadas del *pool* de células SV40-WI 38 transfectadas. Asimismo, el “knockdown” del gen de la SCD se tradujo en modificaciones significativas del perfil de ácidos grasos celulares, que incluyeron la disminución del contenido de MUFA celulares y el aumento de SFA y PUFA.

2. Los SFA exógenos son vehiculizados diferencialmente hacia los triacilglicéridos mientras que los MUFA se incorporan preferentemente en los fosfolípidos en las células deficientes en SCD

La modificación de los lípidos de las membranas altera las propiedades físico-químicas de las mismas (*King, 1978*), así como la actividad de las proteínas asociadas a ellas (*Gould, 1982; Whitcomb, 1988; Field, 1990; Ledoux, 2003*). Por ello, la composición de las membranas debe mantenerse dentro de límites estrechos.

Por otra parte, numerosos trabajos han mostrado que los fosfolípidos de membrana y los triacilglicéridos comparten un acervo común de precursores (*Jackowski, 2000; Igal, 2001; Bagnato, 2003*).

Considerando el enriquecimiento en SFA, dado por la disminución en la actividad de la SCD en las células hSCDas-A, hipotetizamos que el exceso de los mismos será canalizado hacia un “*pool*” de lípidos expandible (como el de los triacilglicéridos), de forma tal de preservar la estructura de las membranas celulares. Contrariamente, los MUFA serán incorporados preferentemente en los fosfolípidos. En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que la incubación de hepatocitos con los ácidos grasos palmítico y esteárico incrementa notablemente la proporción de especies disaturadas de diacilgliceroles y, sin embargo, las especies disaturadas de fosfolípidos aumentan en mucha menor medida (Sundler, 1974). Asimismo, en este trabajo se observó un gran incremento que el contenido de triacilglicéridos totalmente saturados. Las especies de diacilglicéridos con dos ácidos grasos monoinsaturados, por su parte, fueron buenos sustratos tanto para la síntesis de fosfolípidos como de triacilgliceroles.

Hipótesis 1: La incorporación de ácido esteárico exógeno estará disminuida en los fosfolípidos y aumentada en lípidos neutros en las células hSCDas respecto de las células controles.

Diseño experimental: Células hSCDas y controles subconfluentes se incubaron con 0.25 Ci/petri de [¹⁴C] ácido esteárico (2.3 M) en el medio de crecimiento suplementado con 0.5% BSA durante 6 hs. Finalizado el período de incubación, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS suplementado con 0.2% BSA, para eliminar la marcación residual, y los lípidos se extrajeron según el método de Bligh & Dyer (1959). Las distintas especies de los lípidos celulares totales se separaron por TLC y su nivel de radioactividad se detectó por escaneo radiométrico. La identidad de los lípidos se determinó mediante la comparación con estándares lipídicos puros corridos en paralelo, seguido de tinción con vapores de yodo. Se rasparon las bandas correspondientes a los distintos lípidos y se cuantificó su radioactividad por conteo de centelleo líquido. Los moles de ácido graso incorporados se estandarizaron al contenido proteico de células cultivadas en paralelo.

Resultados: El ácido esteárico y/o su derivado monoinsaturado ácido oleico, se incorporaron mayoritariamente en la fracción de fosfolípidos (PL) en todas las líneas celulares y, en menor medida, en los lípidos neutros triacilglicéridos (TAG) y ésteres de colesterol (CE) (Figura 4). No se observaron diferencias significativas en la incorporación de este trazador en la fracción de PL en las células hSCDas respecto de las controles, excepto en la línea hSCDas-C en la que disminuyó ~20%. Tampoco hubo diferencias en la marcación de CE entre las líneas deficientes en SCD y sus controles

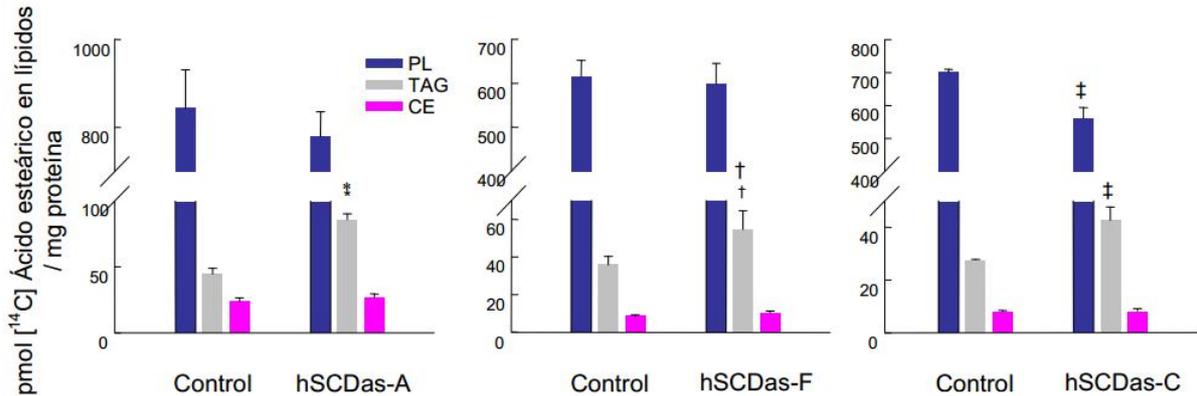


Figura 4: Incorporación de [¹⁴C] ácido esteárico en los lípidos totales de las células hSCDas-A, -F y -C y controles. Células preconfluentes se incubaron con [¹⁴C] ácido esteárico durante 6 hs. Los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC y se cuantificó su radioactividad por contador de centelleo líquido. PL, fosfolípidos; TAG, triacilglicéridos; CE, ésteres de colesterol. Los valores representan la media ± SD de triplicados. * p< 0.001, ‡ p< 0.01, † p< 0.05, t-test

respectivos. Todos los clones hSCDas incorporaron más el ácido esteárico, y/o su derivado ácido oleico, en los TAG en comparación a los controles transfectados con el vector de expresión vacío. En el clon celular hSCDas-A el nivel de marcación en los triacilglicéridos aumentó ~96% respecto de las células controles mientras que en los grupos celulares hSCDas-F y -C el incremento fue del ~53 y 55%, respectivamente. Notablemente, el clon celular que presentó menor actividad desaturante (hSCDas-A) también mostró la mayor incorporación del radiotrazador en los TAG.

Hipótesis 2: Debido a la menor síntesis de MUFA endógenos, los MUFA exógenos serán incorporados en mayor medida en los PL en las células hSCDas que en sus respectivos controles.

Diseño experimental: Las células hSCDas-A y los controles cultivados hasta 80-90% de confluencia, se incubaron con 0.25 Ci/petri de [¹⁴C] ácido oleico (2.1 M) en el medio de crecimiento suplementado con 0.5% BSA durante 6 hs. El análisis de la incorporación en las diferentes especies lipídicas se realizó de la misma forma que en la incubación con [¹⁴C] ácido esteárico (ver página anterior).

Resultados: Las células hSCDas-A incorporaron un ~20% más de [¹⁴C] ácido oleico en los lípidos celulares totales que las células controles (p<0.001). Este incremento se debió a una mayor acilación de la fracción de PL (~22%), respecto de la línea control (Figura 5). El nivel de [¹⁴C] en los lípidos neutros TAG y CE disminuyó un ~35% respecto de la línea transfectada con el vector vacío.

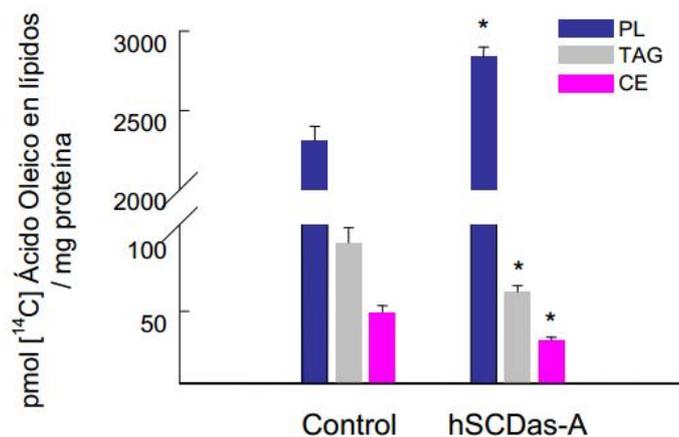


Figura 5: Incorporación de [¹⁴C] ácido oleico en los lípidos totales de las células hSCDas-A y controles. Células preconfluentes se incubaron con [¹⁴C] ácido oleico durante 6 hs. Los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC y se cuantificó su radioactividad por contador de centelleo líquido. PL, fosfolípidos; TAG, triacilglicéridos; CE, ésteres de colesterol. Los valores representan la media \pm SD de cuadruplicados. * $p < 0.001$. *t*-test

Asimismo, el contenido de ácido graso radioactivo no esterificado (FFA) mostró diferencias entre ambas líneas celulares, dependiendo de si el trazador radioactivo era SFA o MUFA (Figura 6). De esta manera, las células hSCDas-A incubadas con [¹⁴C] ácido esteárico presentaron un aumento de ~65% en el nivel de FFA respecto del grupo celular control (Panel A), mientras que no hubo diferencias significativas en el contenido de FFA en las células incubadas con [¹⁴C] ácido oleico (Panel B).

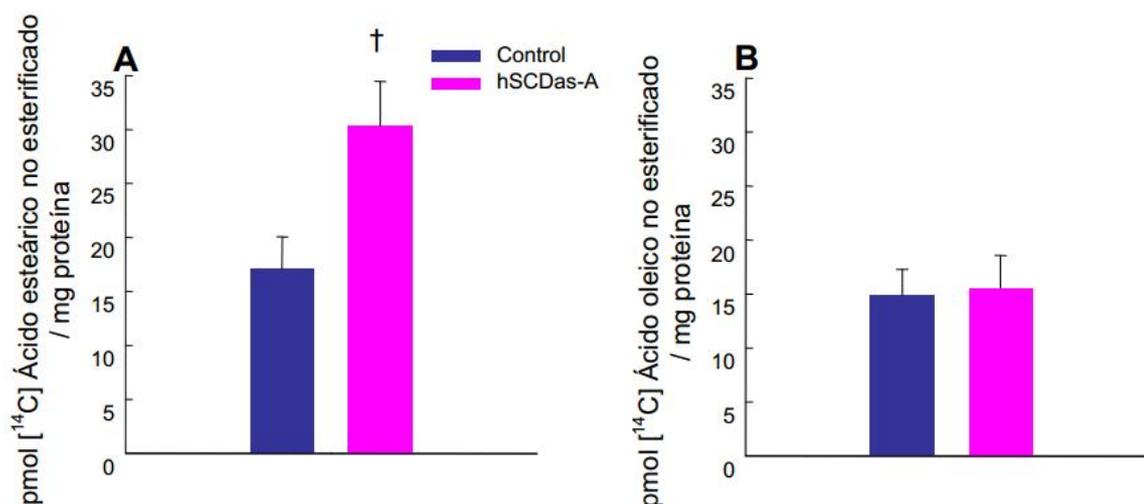


Figura 6: Contenido de [¹⁴C] ácido esteárico u oleico no esterificados en las células hSCDas-A y controles. Células preconfluentes se incubaron con [¹⁴C] ácido esteárico (A) o [¹⁴C] ácido oleico (B) durante 6 hs. Los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC y se cuantificó la radioactividad asociada a los ácidos grasos no esterificados por contador de centelleo líquido. Los valores representan la media ± SD de triplicados (A) o cuadruplicados (B). † p= 0.01, t- test

Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que existe una incorporación diferencial de distintos ácidos grasos exógenos a los lípidos celulares. El ácido saturado esteárico se incorpora en mayor medida en los TAG de las células deficientes en SCD o queda en la fracción de FFA, mientras que el ácido monoinsaturado oleico se canaliza preferentemente a los PL a expensas de su incorporación en lípidos neutros.

3. La síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol está disminuida en las células deficientes en SCD

En las células de mamíferos, los ácidos grasos pueden ser incorporados del medio circundante o pueden ser sintetizados endógenamente a partir de acetil-CoA. Ambos “pooles” de ácidos grasos son sustrato de la síntesis de lípidos acilados, como PL, TAG y CE. Debido a la abundancia de ácidos grasos saturados en las células deficientes en SCD, a las diferencias observadas en la incorporación de ácidos grasos exógenos a las distintas especies lipídicas y considerando que el ácido palmítico inhibe la síntesis de ácidos grasos, nos preguntamos si la síntesis *de novo* de ácidos grasos estaría alterada en nuestro modelo celular.

Hipótesis: La síntesis *de novo* de ácidos grasos estará disminuida en las células deficientes en SCD.

Diseño experimental: Células preconfluentes de las líneas hSCDas-A y controles se

incubaron con 0.5 Ci/petri de [14C]acetato en el medio de crecimiento, durante 24 hs. Finalizado el período de incubación, la radioactividad residual sobre las monocapas celulares se descartó mediante dos lavados con PBS, y los lípidos totales se extrajeron según el método de Bligh & Dyer (1959). Una alícuota del extracto lipídico total se utilizó para analizar la incorporación de [14C]acetato en las distintas especies de lípidos, los cuales fueron resueltos por TLC. El resto de la muestra se saponificó y se contó la radioactividad asociada a la fracción insaponificable, a fin de estimar la síntesis de novo de colesterol. Los picomoles de acetato incorporados a cada lípido se normalizaron al contenido proteico de células cultivadas en paralelo.

Resultados: La incorporación de acetato en los lípidos celulares totales disminuyó ~40% en las células hSCDas-A respecto de las células controles ($p < 0.001$). Al analizar la distribución de la radioactividad entre las diferentes especies lipídicas, observamos que en todos los lípidos acilados la incorporación del trazador disminuyó entre un 40% (PL y TAG) y un 50% (FFA y CE) respecto de la línea celular control (Figura 7A y C). Asimismo, se redujo en 35% la radioactividad asociada a la fracción insaponificable, representada mayoritariamente por colesterol, en las células deficientes en SCD (Figura 7B). Se obtuvo una diferencia semejante al analizar la banda lipídica de la TLC correspondiente a colesterol+diacilglicerol, en la cual el colesterol es el componente mayoritario.

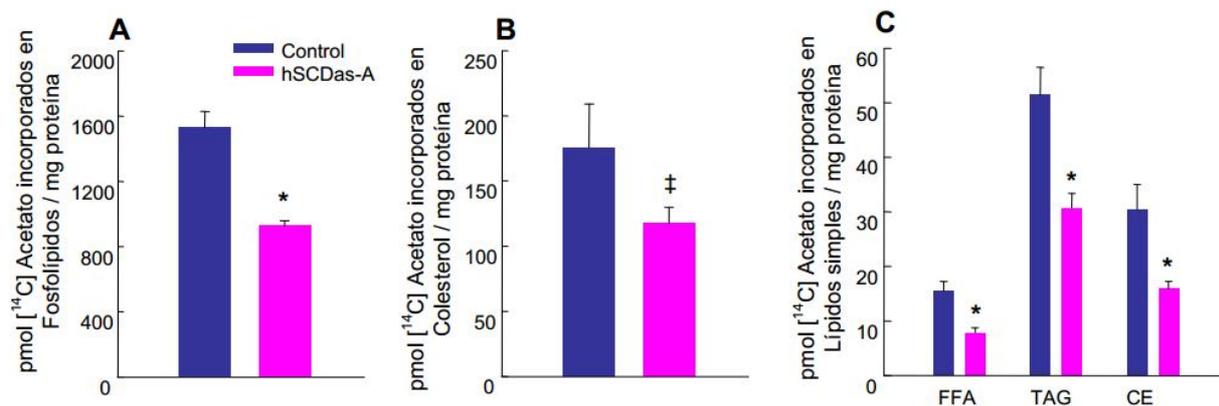


Figura 7: Incorporación de [¹⁴C] acetato en los lípidos de las células hSCDas-A y controles. Células preconfluentes se incubaron con [¹⁴C] acetato durante 24 hs. Los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC y se cuantificó su radioactividad por contador de centelleo líquido. La radiomarcación del colesterol se determinó de la fracción insaponificable de la muestra. FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilglicéridos; CE, ésteres de colesterol. Los valores representan la media \pm SD de cuatuplicados. * $p < 0.001$, ‡ $p < 0.01$. *t*-test

Los datos aquí presentados sugieren que tanto la síntesis *de novo* de ácidos grasos como la del colesterol están disminuidas en las células deficientes en SCD.

4. La síntesis *de novo* de PL y TAG decrece en las células hSCDas

Los ácidos grasos sintetizados endógenamente son utilizados principalmente en la acilación de fosfolípidos en las células transformadas (Kuhajda, 1994; Scaglia, 2005). Los ácidos grasos pueden ser sustrato tanto para la acilación de lípidos preexistentes como de lípidos sintetizados *de novo*. Hipotetizamos que la síntesis endógena de ácidos grasos es necesaria para mantener la activa síntesis *de novo* de fosfolípidos en las células en crecimiento. Por tanto, la disminución en la síntesis de ácidos grasos observada en las células deficientes en SCD conllevará a una reducción en la formación de fosfolípidos *de novo*. Para evaluar la síntesis *de novo* de los glicerofosfolípidos pueden utilizarse el marcador del esqueleto, el glicerol, o compuestos de la cabeza polar, como la colina.

Hipótesis: La síntesis *de novo* de PL estará disminuida en las células hSCDas.

Diseño experimental: Células hSCDas-A y controles, cultivadas hasta 80-90% de confluencia, se incubaron con 5 Ci/petri de [²⁻³H] glicerol en el medio de crecimiento, durante 24 hs. Finalizado el período de incubación, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS con el objeto de eliminar la marcación radioactiva residual, y los lípidos totales se extrajeron según el método de Bligh & Dyer. La incorporación de glicerol en las

distintas especies de glicerolípidos y fosfolípidos se analizó por TLC como se detalla en *materiales y métodos*. Los *spots* lipídicos, detectados por escaneo radiométrico y tinción con vapores de yodo, se rasparon de la cromatoplaaca y su radioactividad se cuantificó mediante conteo de centelleo líquido. Los picomoles de glicerol incorporados a cada lípido se normalizaron al contenido proteico de células cultivadas en paralelo.

Resultados: La incorporación de [^3H] glicerol en lípidos totales disminuyó un 50% en las células hSCDas-A respecto de las transfectadas con el vector vacío ($p < 0.001$, *t*-test). Esta reducción fue similar en las dos especies de glicerolípidos marcadas, PL (50%) y TAG (~45%) (Figura 8).

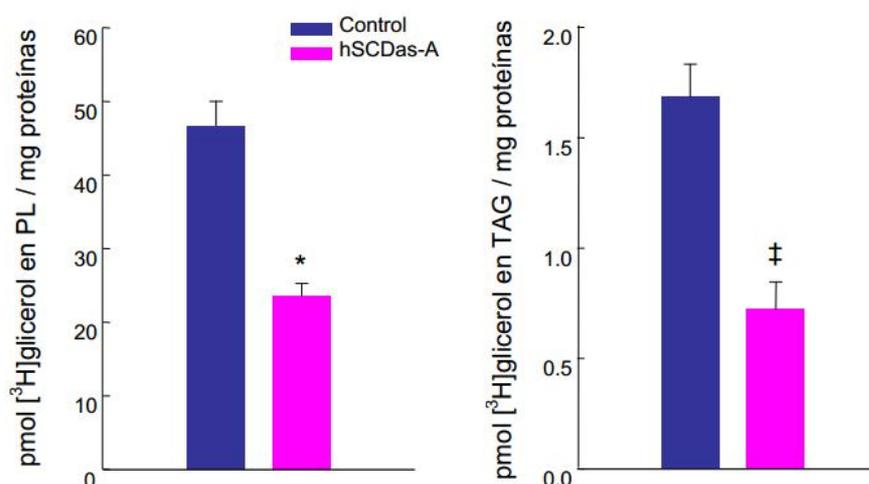


Figura 8: Incorporación de [^3H] glicerol en los lípidos de las células hSCDas-A y controles. Células preconfluentes se incubaron con [^3H] glicerol durante 24 hs. Los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC y se cuantificó su radioactividad por contador de centelleo líquido. PL, fosfolípidos; TAG, triacilglicéridos. Los valores representan la media \pm SD de cuatuplicados. * $p < 0.001$, ‡ $p < 0.01$. *t*-test

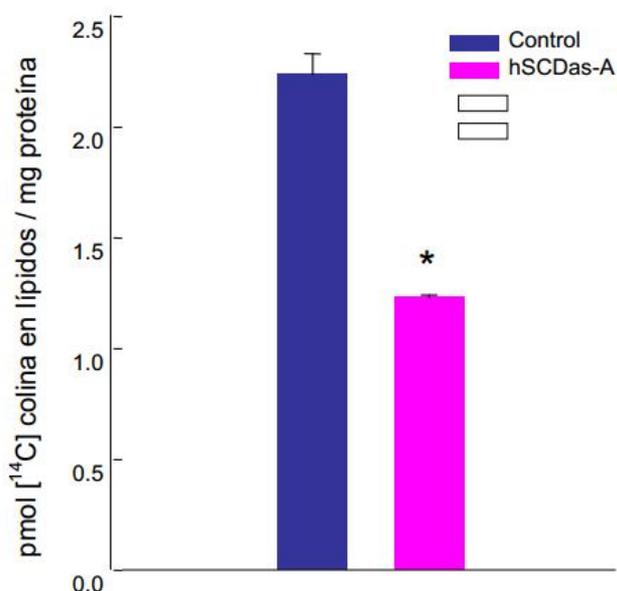
Al analizar la radioactividad asociada a las especies mayoritarias de fosfolípidos, observamos que la incorporación de glicerol en las células hSCDas-A fue ~51% menor en las fracciones fosfatidilinositol+fosfatidilserina y fosfatidilcolina y 43% menor en fosfatidiletanolamina ($p < 0.001$ en todos los casos) respecto de las células controles (*datos no mostrados*).

La disminución en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina fue ulteriormente confirmada utilizando como trazador [metil- ^{14}C]colina. La elección de este radiotrazador se realizó tomando en cuenta que la denominada “vía de la CDP- colina” es la más importante en la síntesis de fosfatidilcolina en mamíferos. Esta ruta biosintética comprende la fosforilación

de la colina exógena y su activación a CDP-colina, la cual dona el grupo fosfocolina al diacilglicerol para formarse entonces la fosfatidilcolina (Jackowski, 2005).

Las células hSCDas-A y controles se cultivaron en el medio de crecimiento con 0.5 Ci/petri [metil- ^{14}C] colina durante 24 hs y la radioactividad asociada a los lípidos celulares totales fue determinada por conteo de centelleo líquido. Bajo estas condiciones la incorporación de [^{14}C]colina en la fracción lipídica disminuyó 45% en las células deficientes en SCD respecto de las controles (Figura 9). Si bien en este experimento no se discriminó entre la incorporación de colina en fosfatidilcolina y esfingomiélin, la marcación en esta última representa menos del 10% de la radioactividad total incorporada en los lípidos (Bagnato *et al.*, 2003), por lo que podemos considerar que el cambio observado se produce principalmente en la fracción de fosfatidilcolina.

Figura 9: Incorporación de [metil- ^{14}C] colina en los lípidos de las células hSCDas-A y controles. Células preconfluentes se incubaron con [^{14}C] colina durante 24 hs. Los lípidos celulares totales se extrajeron y se cuantificó su radioactividad por contador de centelleo líquido. Los valores representan la media \pm SD de cuatuplicados. * $p < 0.001$. *t*-test



En conjunto esta serie de experimentos de marcación metabólica sugieren que la síntesis *de novo* de PL y TAG está reducida en las células hSCDas, probablemente debido a la deficiencia de ácidos grasos endógenos. De modo opuesto, el recambio de ácidos grasos exógenos en estas especies lipídicas está incrementado, siendo el ácido oleico (18:1 n-9) segregado diferencialmente hacia los fosfolípidos y el ácido esteárico (18:0) hacia TAG. Asimismo la síntesis endógena de colesterol disminuye en las células deficientes en SCD, lo que denota la importancia de esta enzima en el metabolismo lipídico general y en particular en la síntesis de lípidos de membrana.

5. La masa de FFA y TAG se incrementa en las células hSCDas-A, principalmente gracias a un aumento en el contenido de SFA

La SCD ha sido vinculada principalmente al metabolismo de los lípidos de reserva en ratones. Durante la diferenciación adipocitaria, la actividad de la esteroil-CoA desaturasa aumenta 30 veces respecto de las células indiferenciadas (*Kasturi, 1982*). Asimismo, ratones deficientes en SCD1 (SCD1 *-/-*) muestran niveles disminuidos de triacilglicéridos y ésteres de colesterol en hígado y piel (*Miyazaki, 2000 y 2001*) así como una reducción en la grasa corporal total (*Cohen et al, 2002*).

En las células hSCDas las fracciones de TAG y FFA exhiben altos niveles de incorporación de ácido esteárico exógeno y niveles reducidos de incorporación de ácido oleico (Figuras 4, 5 y 6). A su vez, tanto la síntesis *de novo* de TAG, estimada a partir de la incorporación de [3H]glicerol, como la incorporación de ácidos grasos sintetizados endógenamente disminuyen en las células hSCDas. Debido a que estas diferencias en la marcación radioactiva de TAG y FFA con los distintos radiotrazadores se dan en el contexto de la depleción de SCD, estudiamos si la masa de ambas fracciones lipídicas está alterada en las células hSCDas.

Diseño experimental: Los lípidos celulares totales extraídos de células preconfluentes y separados por TLC, se extrajeron de la sílicagel. Los ésteres metílicos obtenidos por transesterificación de las distintas especies lipídicas se cuantificaron por GLC utilizando como estándar interno el ácido graso heptadecanoico (17:0), el cual no está presente en las células de mamíferos.

Resultados: En las células hSCDas-A, la masa de TAG y FFA se

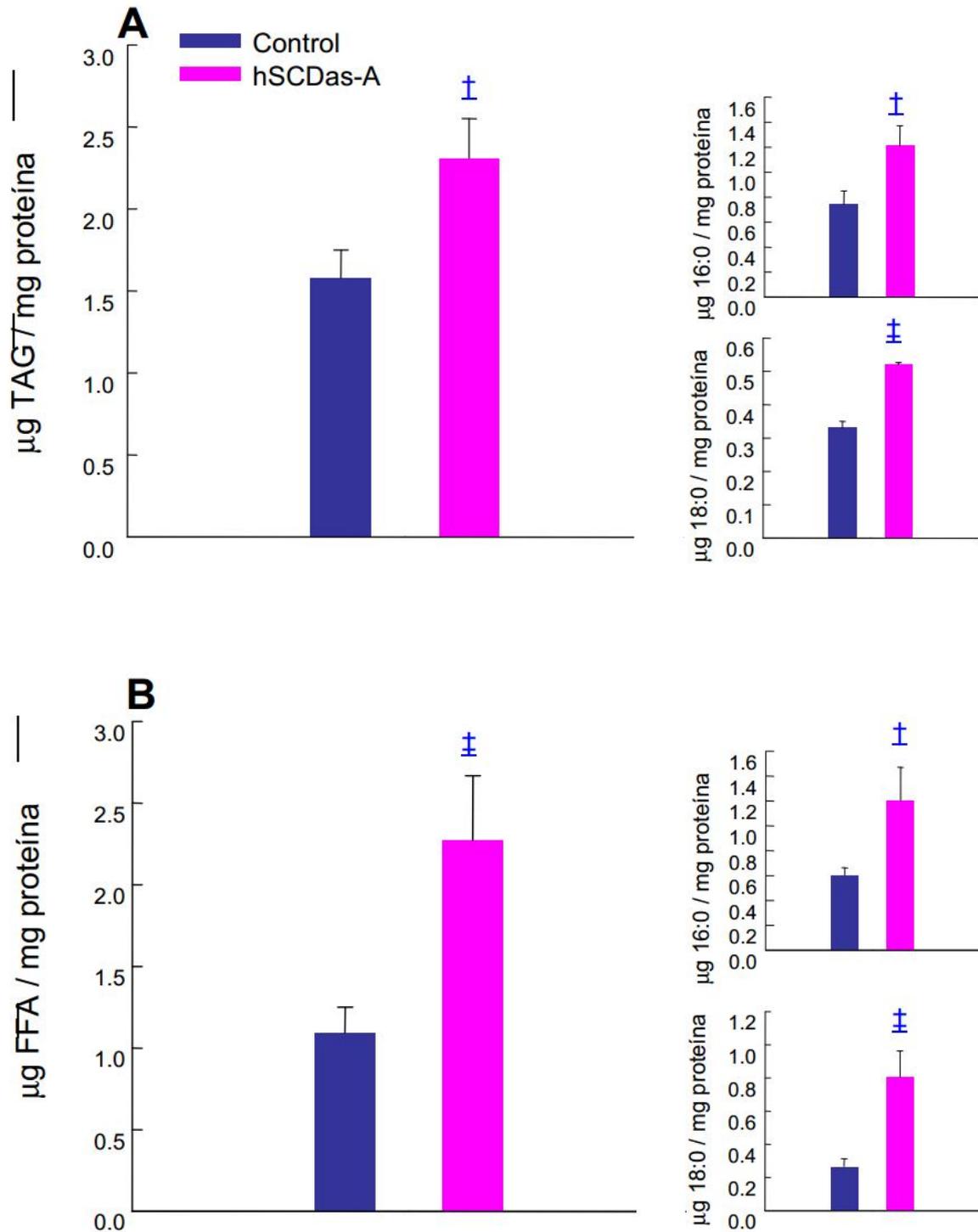


Figura 10: Cuantificación del contenido de TAG (A) y FFA (B) de las células hSCDas-A y controles. Los lípidos celulares se separaron por TLC, los TAG y FFA se extrajeron de la sílica y los ésteres metílicos derivados de sus ácidos grasos constituyentes se analizaron por GLC. TAG, triacilglicéridos; FFA, ácidos grasos no esterificados. Los valores representan la media \pm SD de triplicados. \ddagger $p < 0.01$, \dagger $p < 0.05$, t -test

incrementó ~46 y 100% respectivamente, en relación a las células del grupo control (Figura 10 A y B). Este aumento se debió principalmente al mayor contenido de SFA, 16:0 y 18:0, en estas fracciones lipídicas (Figura 10, paneles internos).

El contenido de fosfolípidos celulares totales, no difirió significativamente entre ambas líneas celulares (*datos no mostrados*)

Estos datos sugieren que, a diferencia de lo que sucede en ratones knockout para el gen de la SCD1, en este modelo celular la deficiencia de SCD induce un incremento en la masa de TAG enriquecidos en ácidos grasos saturados. Dado que la síntesis *de novo* de ácidos grasos está disminuida en las células hSCDAs, el aumento en la masa de TAG podría estar dado por la mayor incorporación de los ácidos grasos saturados exógenos.

6. La proliferación celular disminuye en las células deficientes en SCD y no revierte con el agregado de ácido oleico exógeno

Toda célula necesita duplicar sus membranas antes de dividirse. La biosíntesis de los distintos lípidos de membrana está coordinada entre sí y con el ciclo celular (*Cornell, 1980; Jackowski, 1994*). Asimismo, la síntesis de ácidos grasos es indispensable para el crecimiento y supervivencia celular y está exacerbada en células neoplásicas (*Zhou, 2003; Kuhajda, 1994 y 2000*). Teniendo en cuenta la disminución en la síntesis de fosfolípidos y colesterol en las células hSCDAs, evaluamos si estos cambios en el metabolismo lipídico impactan sobre la proliferación celular.

Hipótesis: Debido a que la deficiencia de SCD disminuye la síntesis de membranas, la proliferación celular estará disminuida en las células hSCDAs respecto de las controles.

Diseño experimental: Células preconfluentes de las líneas hSCDAs-A, -F y -C y grupos de células controles se incubaron con 1 Ci [3H] timidina en el medio de crecimiento durante 2 hs. La incorporación de [3H] timidina al ADN celular se determinó como se describe en *Materiales y métodos*.

Resultados: Todas las líneas celulares hSCDAs mostraron menor incorporación de [3H]timidina en el ADN en comparación a las células controles (Figura 11), aunque en distinto grado. En el clon celular hSCDAs-A la incorporación de [3H] timidina disminuyó ~62% respecto de la línea control mientras que en las células hSCDAs-F y -C la reducción fue de ~49% y 47% respectivamente. Analizando estos resultados junto a los datos de la Figura 1, puede observarse la existencia de una correlación entre el nivel de actividad de la SCD y la

tasa de proliferación celular estimada mediante la síntesis de ADN celular.

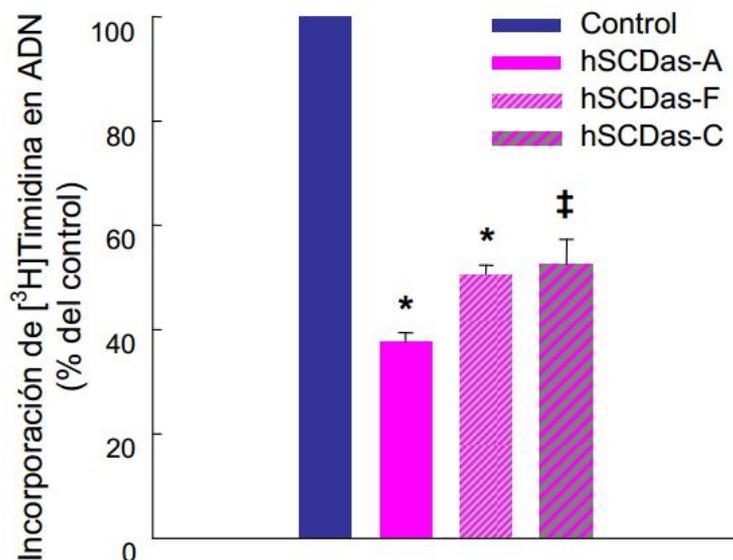


Figura 11: Síntesis de ADN en las células hSCDas y controles. Células preconfluentes de ambos grupos experimentales se incubaron con [³H] timidina durante 2 hs. La incorporación de timidina al ADN se determinó por conteo de centelleo líquido y se estandarizó al contenido proteico. Los valores se expresan como porcentaje del control y representan la media \pm SD de triplicados. * $p < 0.001$, ‡ $p < 0.01$. *t*-test

Para corroborar esta observación, se analizó la proliferación de las células hSCDas-A y controles por recuento celular directo y se graficó la curva de crecimiento como se detalla en *Materiales y métodos*.

Así se pudo apreciar que, a partir de las ~72 hs, el número de células hSCDas-A disminuyó significativamente respecto de las células controles (Figura 12). El tiempo de duplicación poblacional, estimado a partir de la ecuación de la curva, fue de 30.1 hs para las células transfectadas con el vector vacío y de 50.5 hs para las deficientes en SCD.

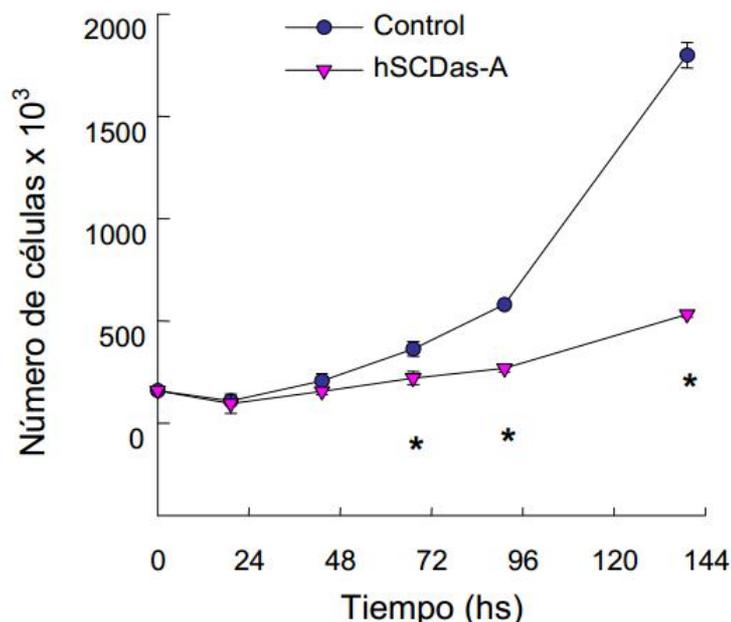
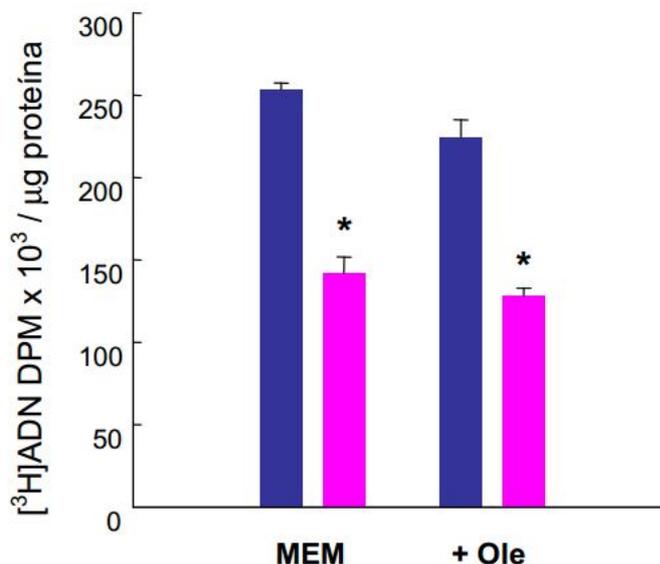


Figura 12: Curvas de crecimiento de las células hSCDas-A y controles. 1.6×10^5 células del clon A y controles se sembraron en petris de 60 mm. A diferentes intervalos de tiempo se tripsinizaron y contaron en cámara de Neubauer. Los valores representan la media \pm SD de triplicados. En algunos puntos, las barras de los SD son tapadas por los símbolos. * $p < 0.05$ ANOVA seguida de Bonferroni t -test.

Notablemente, la suplementación del medio de crecimiento con 200 M de ácido oleico acompañado con BSA durante 72 hs, no revirtió la menor incorporación de [³H] timidina en las células deficientes en SCD (Figura 13). La incorporación de [³H] timidina al ADN celular permaneció significativamente reducida en las células hSCDas-A aún después de 4 semanas de crecimiento celular en medio suplementado con 200 M ácido oleico (*datos no mostrados*).

Figura 13: Síntesis de ADN en las células hSCDas-A y controles.

Células preconfluentes crecidas en medio de crecimiento suplementado o no con ácido oleico (Ole) 200 μ M (ácido graso:BSA 2:1) durante 72 hs, se incubaron con [³H] timidina durante 2 hs. La incorporación de timidina al ADN se determinó por conteo de centelleo líquido y se estandarizó al contenido proteico. Los valores representan la media \pm SD de triplicados. * $p < 0.001$. t -test



Estos resultados indican que la actividad de SCD es esencial para el crecimiento de las células transformadas y apoyan la idea de que la síntesis endógena de MUFA es necesaria para la proliferación celular.

7. La deficiencia en SCD induce apoptosis independiente de ceramidas en las células SV40-WI 38

El término “lipotoxicidad” hace referencia al estado patológico de los tejidos que puede aparecer cuando el contenido ácidos grasos supera las necesidades oxidativas de esos tejidos y el exceso de ácidos grasos es derivado a rutas metabólicas deletéreas, no-oxidativas (Unger, 2001). Si bien en un principio se hipotetizó que el incremento de TAG en tejidos no adiposos era el responsable de la disfunción y muerte celular (Shimabukuro, 1998a; Finstad, 1998), trabajos posteriores han sugerido que no son los TAG en sí mismos sino los ácidos grasos y sus derivados (como es el caso de las ceramidas) los que ejercen el efecto tóxico sobre las células (Zhou, 2000; Cnop, 2001). El contenido de TAG en células no adiposas, sin embargo, puede servir como índice del metabolismo no-oxidativo general (Unger, 2001).

Por otra parte, numerosos trabajos muestran un efecto diferencial de los ácidos grasos exógenos sobre la viabilidad celular, siendo los ácidos grasos saturados generalmente más citotóxicos que los insaturados (ver más adelante). Sin embargo, la mayor parte de dichos estudios se realizaron mediante incubaciones con concentraciones muy elevadas de ácidos grasos exógenos por períodos de tiempo cortos, y poco se sabe respecto del desbalance de ácidos grasos intracelulares y el papel de la SCD en la muerte celular.

Considerando el notable aumento de TAG y FFA, especialmente enriquecidos en ácidos grasos saturados, en la línea deficiente en SCD, nos preguntamos si la viabilidad celular estaría comprometida en estas células.

Hipótesis 1: La muerte celular programada estará aumentada en las células hSCDAs debido al excesivo contenido de TAG y FFA saturados.

Diseño experimental: Células preconfluentes de ambos grupos experimentales se incubaron con 0.4 Ci [3H]timidina durante 24 hs para producir la marcación radioactiva del ADN celular. Pasado este período de marcación, las monocapas se lavaron con PBS para eliminar los restos de [3H]timidina y se dejaron otras 24 hs en medio de crecimiento. La distribución de la [3H]timidina entre el ADN fragmentado y no fragmentado se determinó como se describió en la sección de *Materiales y métodos*. Se analizó asimismo la morfología nuclear mediante la tinción con 10 M Hoestch 33258 y la actividad de caspasa-3 *in vitro*, como se describió en *Materiales y métodos*. Como control positivo de apoptosis se incubaron

células en paralelo con 40 M etopósido.

Resultados: El porcentaje de muerte celular, estimado por la proporción de ADN fragmentado marcado radioactivamente, se incrementó ~50% en las células deficientes en SCD (Figura 14 A) en condiciones estándares de cultivo.

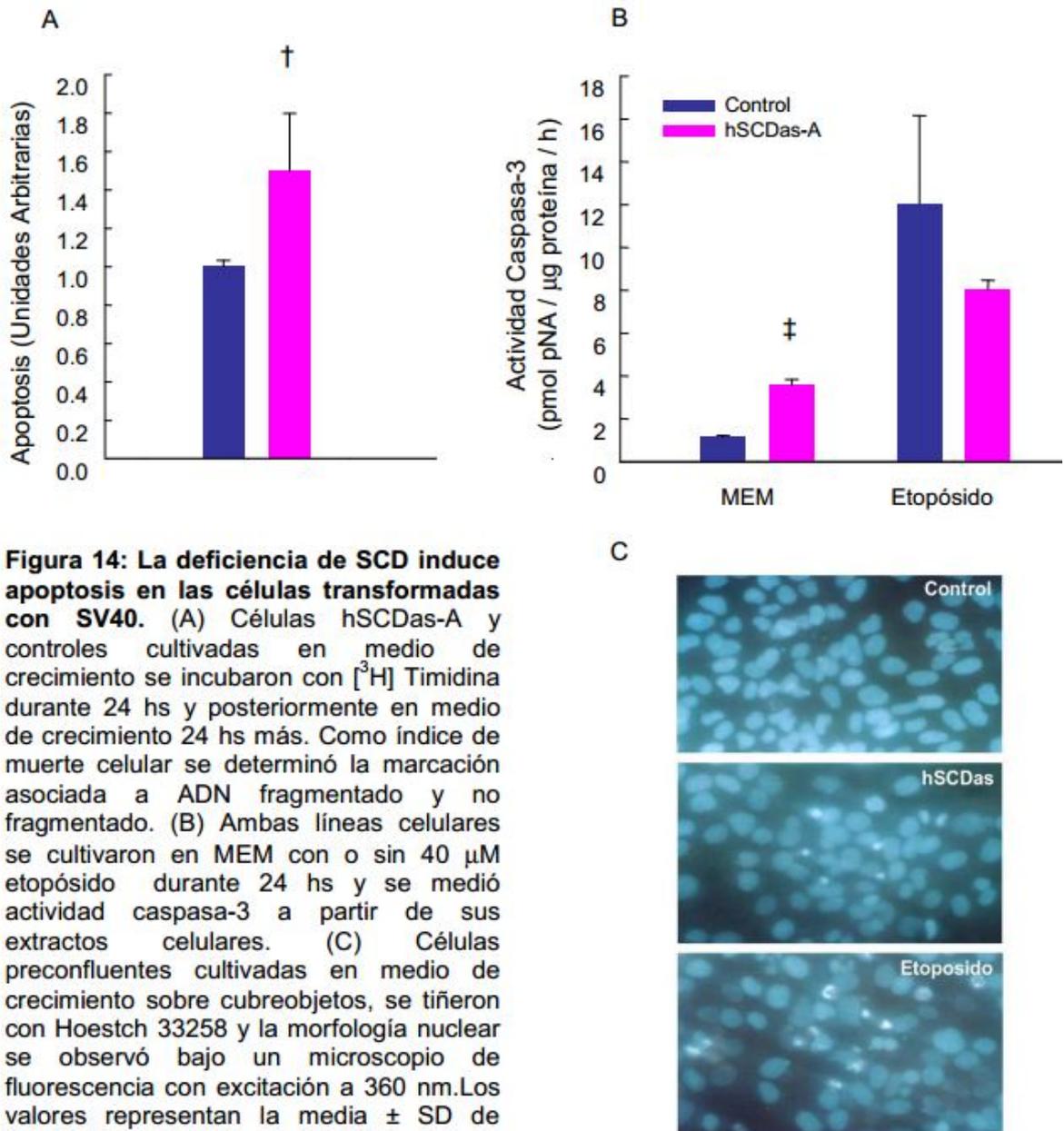


Figura 14: La deficiencia de SCD induce apoptosis en las células transformadas con SV40. (A) Células hSCDas-A y controles cultivadas en medio de crecimiento se incubaron con [³H] Timidina durante 24 hs y posteriormente en medio de crecimiento 24 hs más. Como índice de muerte celular se determinó la marcación asociada a ADN fragmentado y no fragmentado. (B) Ambas líneas celulares se cultivaron en MEM con o sin 40 µM etopósido durante 24 hs y se midió actividad caspasa-3 a partir de sus extractos celulares. (C) Células preconfluentes cultivadas en medio de crecimiento sobre cubreobjetos, se tiñeron con Hoestch 33258 y la morfología nuclear se observó bajo un microscopio de fluorescencia con excitación a 360 nm. Los valores representan la media ± SD de triplicados, † p<0.05, ‡ p<0.01. *t*-test.

La condensación y/o fragmentación de la cromatina, característicos de la apoptosis, también aumentó considerablemente (Figura 14 C). Asimismo, la actividad de caspasa-3, enzima responsable del clivado de numerosas proteínas durante la apoptosis, determinada a partir de extractos de células crecidas en MEM, fue 3 veces mayor a la de los controles

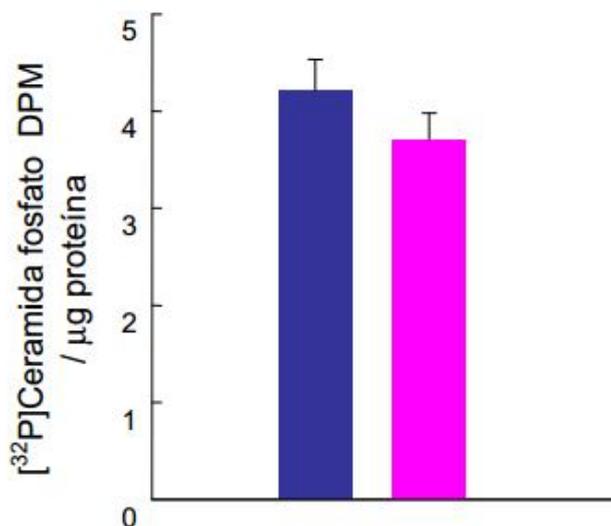
(Figura 14 B).

Hipótesis 2: Dado el incremento en los ácidos grasos saturados endógenos, precursores de la síntesis de ceramidas, el contenido de las mismas estará aumentado en la línea deficiente en SCD respecto de la control.

Diseño experimental: El contenido de ceramidas se determinó utilizando el ensayo de la Diacilglicerol kinasa de *E. coli* con [32 P] ATP.

Resultados: No se observaron diferencias significativas en el nivel de ceramidas (Figura 15) ni en el de diacilglicerol (*datos no mostrados*) entre las líneas hSCDas-A y control.

Figura 15. El contenido de ceramidas no varía entre las células hSCDas-A y controles. Los lípidos celulares se extrajeron por el método de Bligh & Dyer. La [32 P]ceramida-fosfato sintetizada *in vitro* por la DAGK de *E. coli* se resolvió por TLC y cuantificó en un PhosphorImager. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.



En conjunto, estos resultados describen por primera vez la relación estrecha entre la SCD y la muerte celular programada en células transformadas y sugieren fuertemente que la presencia de la SCD es esencial para la supervivencia de estas células. El incremento en la muerte celular en las células deficientes en SCD no estaría mediado, sin embargo, por un aumento en el contenido de ceramidas.

8. Las células hSCDas-A son más sensibles a la apoptosis inducida por ácido palmítico.

Numerosos trabajos han revelado un comportamiento diferencial de los distintos ácidos grasos respecto de la viabilidad celular. Una elevada concentración de ácidos grasos saturados exógenos induce apoptosis mientras que las especies insaturadas no comprometen la supervivencia celular, o incluso, promueven la proliferación y rescatan a las células de la apoptosis inducida por los saturados (*de Vries, 1997; Hardy, 2000 y 2003; Listenberger, 2001 y 2003; Maedler, 2001; Ulloth, 2003; Beeharry, 2004; Mishra, 2005*). Más

aún, la sobreexpresión de la SCD1 murina en células de ovario de hámster chino (CHO) previene la apoptosis inducida por ácido palmítico exógeno (*Listenberger, 2003*).

Hipótesis: Las células hSCDas serán más susceptibles a la muerte celular inducida por ácido palmítico exógeno.

Diseño experimental: Células hSCDas-A y controles subconfluentes se marcaron con 0.4 Ci [3H]timidina en el medio de crecimiento durante 24 hs. A continuación, se descartó la radioactividad residual sobre las monocapas celulares mediante lavados con PBS y se incubó a las células con distintas concentraciones de ácidos grasos acomplejados con BSA en medio libre de FBS, para evitar la influencia de los ácidos grasos del mismo, durante 24 hs más. En algunos experimentos la relación molar ácido graso:BSA fue de 5:1 de forma tal de emular una condición patofisiológica con alto contenido de FFA no unidos, pero que no supere su umbral de solubilidad (*Kleinfeld, 1996; Cnop, 2001*) mientras que en otros esta relación fue 2:1, la cual está dentro de los límites fisiológicos normales del suero humano, con bajo contenido de FFA no unidos a albúmina (*Richieri, 1995*). Grupos de células tratadas con 40 M etopósido se incluyeron al diseño, como control positivo de apoptosis. El porcentaje de apoptosis se determinó mediante la cuantificación del ADN fragmentado, como se describió anteriormente.

Resultados: Las células hSCDas-A presentaron un incremento del ~70% en la apoptosis respecto de la línea control al ser incubada en MEM libre de FBS. El ácido palmítico, en relación 5:1 con BSA, indujo un aumento en la muerte celular de forma dosis-dependiente en ambas líneas celulares (Figura16 A). Sin embargo, las células deficientes en SCD fueron más sensibles al exceso de ácido palmítico. En las células controles, el tratamiento con 250 y 500 M de 16:0 incrementó la apoptosis en ~1.8 y 2.7 veces respectivamente, mientras que en la línea hSCDas-A el aumento fue de ~2.5 y 4.5 veces. El ácido oleico no indujo cambios en ninguna de las líneas celulares ni revirtió el alto nivel basal de apoptosis de las células deficientes en SCD. Al igual que en otros modelos experimentales, la coincubación con ácido oleico rescató a las células de la apoptosis inducida por el ácido palmítico.

En los experimentos que asemejan condiciones más fisiológicas (ácido graso:BSA 2:1), ni la incubación con 250 ni con 500 M de ácido palmítico incrementaron la muerte celular por sobre el nivel de las células no tratadas

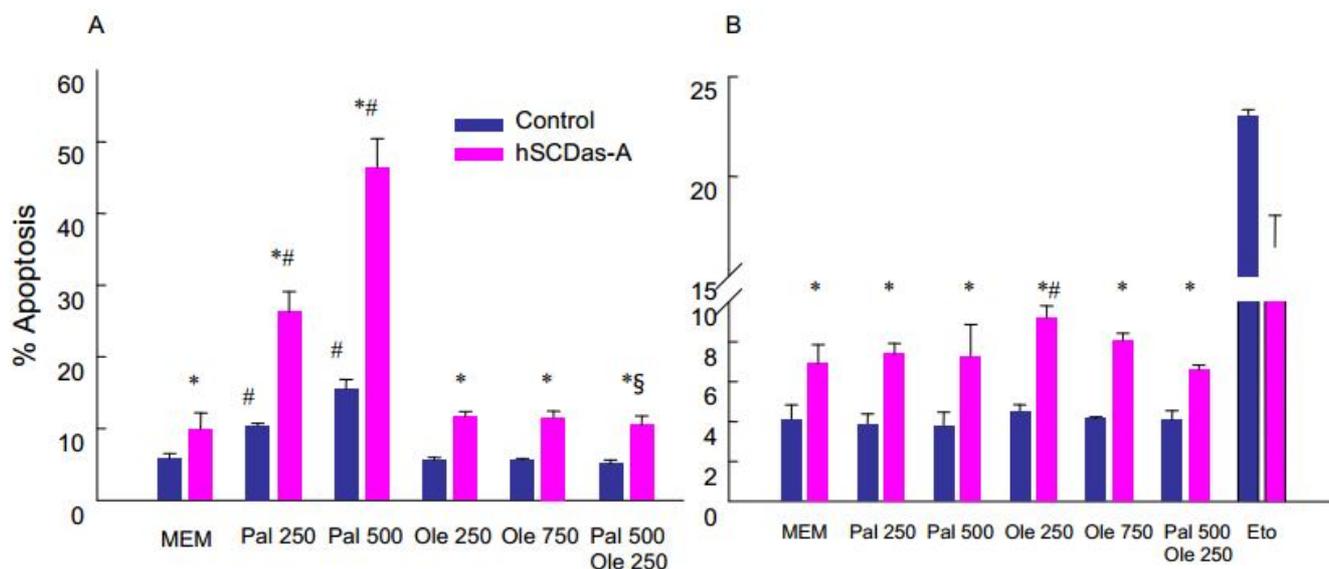


Figura 16. La SCD protege a las células de la apoptosis inducida por ácido palmítico libre. Células controles y hSCDas-A se marcaron con $[^3\text{H}]$ timidina durante 24 hs y posteriormente se incubaron con distintas concentraciones de ácido palmítico (Pal) y oleico (Ole) acomplejados con BSA en relación molar 5:1 (A) o 2:1 (B), durante 24 hs en medio libre de FBS. El porcentaje de apoptosis se determinó como se describió anteriormente. Los valores representan la media \pm SD. N=3 o 4. Eto, etopósido 40 μM . * $p < 0.05$ respecto de la línea control bajo las mismas condiciones; # $p < 0.05$ respecto de la misma línea bajo condiciones controles (MEM); § $p < 0.05$ respecto de la línea hSCDas tratada con ácido palmítico 250 o 500 μM .

(Figura 16 B). La menor tasa de muerte celular observada en las células hSCDas tratadas con etopósido respecto de las controles tratadas con el mismo agente, puede estar relacionada con el hecho de que las células en mitosis son más sensibles a este agente proapoptótico y a que el nivel de topoisomerasa II, la enzima blanco del etopósido, varía de acuerdo al estado celular (proliferación, diferenciación, apoptosis) (Estey, 1987; Sugimoto, 1998; Chow, 1987). Por tanto, la SCD, al alterar las tasas de proliferación y apoptosis, puede modificar la sensibilidad a agentes proapoptóticos como el etopósido.

En conjunto, esta serie de experimentos apoyan la hipótesis de que la SCD es importante para la supervivencia celular en condiciones de un alto contenido de ácidos grasos saturados exógenos libres. También refuerzan la idea de la función diferencial de los ácidos grasos respecto de la apoptosis celular, siendo proapoptóticas las especies

saturadas. El ácido monoinsaturado oleico protege a las células de la apoptosis inducida por ácido palmítico, pero no revierte el incremento basal de la muerte celular en la línea deficiente en SCD, en concordancia con lo observado para la proliferación celular (Figura 13), lo cual reafirma la importancia de su síntesis endógena en la viabilidad celular.

9. La disminución de SCD abroga el crecimiento independiente de anclaje de las células transformadas con SV40

Dadas las diferencias existentes en la proliferación y muerte celular entre las células hSCDas y controles, nos preguntamos si la depleción de SCD alteraría otras características propias de las células transformadas, como el crecimiento independiente de anclaje.

La adhesión a un sustrato sólido y la extensión sobre el mismo son prerequisites para que la mayor parte de las células normales sobrevivan y proliferen en cultivo. La adhesión celular desencadena una serie de vías de señalización que permiten superar el punto de control de la fase G1 del ciclo celular (Schulze, 1996; Zhu, 1996; Chen, 1997). Sin embargo, las células transformadas muestran una menor dependencia de la adhesión para proliferar (fenómeno denominado “crecimiento independiente de anclaje”) y crecen sobre sustratos semisólidos como el agar (Carstens, 1996; Kang, 1996; Qiu, 1997; Yang, 1998). Si bien alteraciones del metabolismo lipídico promueven cambios en la capacidad de adhesión celular (Conforti, 1990; Lefkowitz, 1991; Singh, 1995) y el crecimiento independiente de anclaje en las células neoplásicas (Bagnato, 2003), hasta el momento no existe información respecto de la influencia de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados sobre las propiedades de adhesión celular.

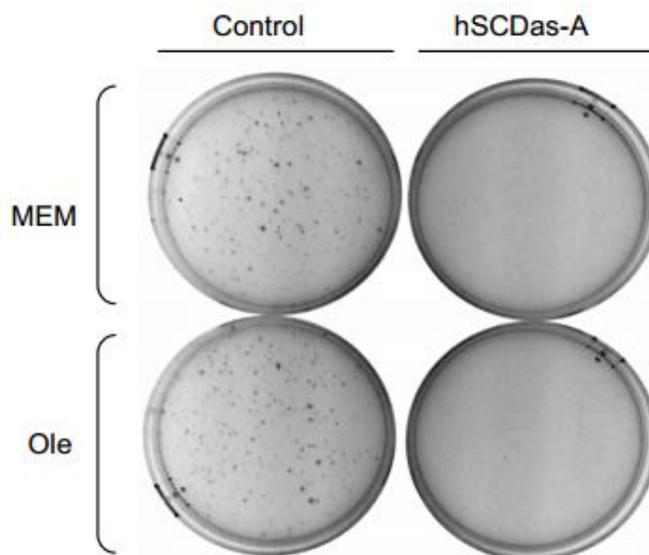
Hipótesis: La deficiencia de SCD promoverá alteraciones en el crecimiento de las células transformadas sobre un sustrato semisólido.

Diseño experimental: 1×10^4 células controles y hSCDas-A se resuspendieron en 0.3% p/v agar en medio de crecimiento y se sembraron sobre una capa solidificada de 0.6% p/v agar en medio de crecimiento, como se describió en “materiales y métodos”. Después de 4 semanas, las colonias se tiñeron con bromuro de etidio en PBS y fotografiaron bajo luz ultravioleta. En otro experimento, ambas líneas celulares se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con 200 M de ácido oleico acomplejado con BSA (relación molar 2:1, respectivamente) durante un mes y se sembraron como se describió anteriormente en medio de crecimiento-agar suplementado de igual manera.

Resultados: Como se observa en la Figura 17, las células controles formaron numerosas colonias macroscópicas en el medio semisólido, mientras que las células deficientes en SCD fueron incapaces de producir este tipo de formaciones multicelulares.

Más aún, la posible presencia de colonias microscópicas de células hSCDas fue descartada al observar los cultivos bajo microscopio de fase invertida. De modo notable, el agregado de ácido oleico exógeno previo y durante el ensayo no revirtió la dependencia de anclaje para el crecimiento de las células hSCDas-A.

Figura 17: Crecimiento de colonias multicelulares en agar blando. 1×10^4 Células cultivadas en medio de crecimiento suplementado o no con ácido oleico $200 \mu\text{M}$, se sembraron en agar-MEM. Luego de 4 semanas, las colonias se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo un transiluminador UV. Cada placa es representativa de los cuadruplicados. MEM, medio de crecimiento; Ole, medio de crecimiento con ácido oleico $200 \mu\text{M}$.



Estas observaciones indican que la deficiencia de SCD suprime completamente la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de las células transformadas con SV40. Asimismo, sugieren que los ácidos grasos monoinsaturados sintetizados endógenamente, independientemente de la presencia de ácido oleico exógeno, son necesarios para sostener el crecimiento independiente de anclaje.

10. Tumorigenicidad: Generación del modelo de células A549 deficientes en SCD

Otra característica de la mayoría de las células transformadas es su capacidad de generar tumores cuando son inoculadas en un modelo animal apropiado. La inducción de tumores con el virus SV40 muestra su mayor eficiencia en hámsters recién nacidos (*Jasani, 2001*), y las células SV40-WI 38 no son tumorigénicas en ratones genéticamente atímicos (*Bagnato, observaciones no publicadas*).

Debido a estas restricciones del modelo celular, evaluamos la relación entre la expresión de SCD y la tumorigenicidad *in vivo* en la línea de carcinoma de pulmón humano A549. Para ello, se utilizó la misma estrategia que con las células SV40-WI 38; es decir, se transfectaron establemente las células A549 con el plásmido pcDNA3-hSCDas o con el

vector vacío (línea control). Después de la selección clonal, se verificó la depleción en la actividad SCD y los potenciales cambios producidos en el fenotipo celular.

Así, la actividad de la SCD disminuyó significativamente (~20%) en la línea celular A549 transflectada con el cADN de la SCD en posición antisentido (hSCDas-) respecto de las células controles (Figura 18A). Como se observara en las células SV40 deficientes en SCD, la incorporación de [¹⁴C]ácido esteárico se incrementó ~42% en la fracción de TAG (Figura 18 B), lo cual sugiere que es una característica asociada a la deficiencia de SCD en distintos modelos de células humanas transformadas. Notablemente, en las células hSCDas-, este radiotrazador fue incorporado en menor medida (~11%) en los fosfolípidos celulares, indicando que la deficiencia en SCD tuvo implicancias más profundas sobre el metabolismo de los fosfolípidos que en las células hSCDas-A, derivadas de SV40-WI 38.

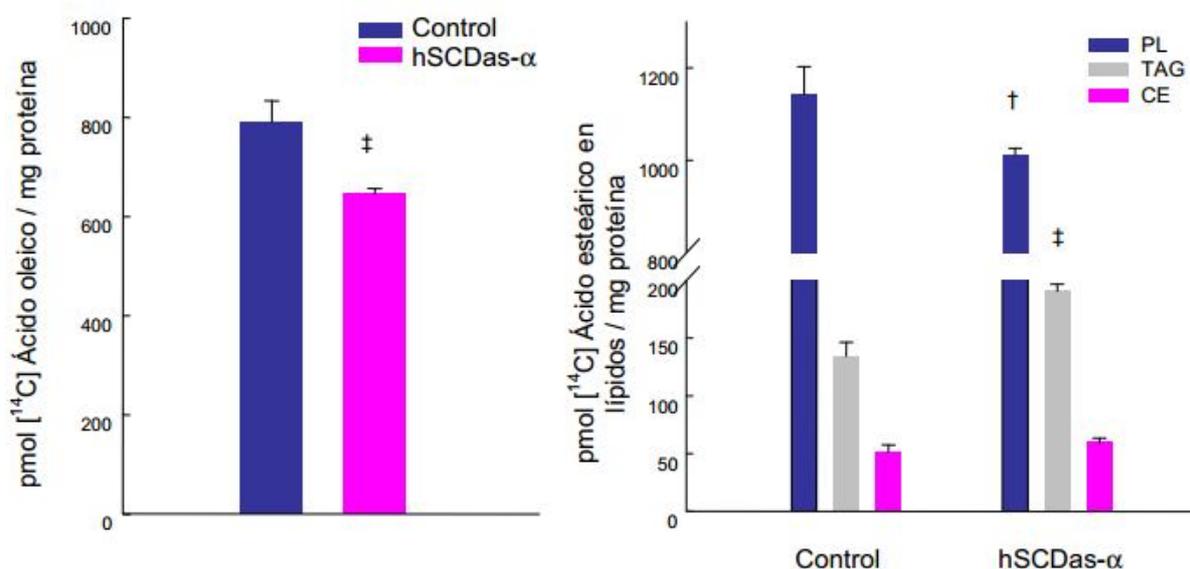


Figura 18: Actividad de SCD e incorporación de [¹⁴C] 18:0 en células A549 hSCDas-α y sus controles. Células preconfluentes de ambos grupos se incubaron con [¹⁴C] ácido esteárico durante 6 hs. Los ésteres metílicos de ácidos grasos derivados de los lípidos celulares totales se resolvieron por TLC impregnada con nitrato de plata, y la radioactividad del sustrato ácido esteárico y su producto de desaturación se cuantificaron mediante conteo de centelleo líquido (Panel Izquierdo). Por otra parte, los lípidos celulares totales se separaron por TLC y se determinó la radioactividad asociada a las distintas especies lipídicas por conteo de centelleo líquido (Panel Derecho). Los valores representan la media ± SD de triplicados. ‡ p < 0.01, † p < 0.05, t-test.

La disminución en la actividad SCD se reflejó asimismo en la composición de ácidos grasos celulares (Tabla 3). El ácido graso saturado esteárico se incrementó ~26% y el ácido monoinsaturado palmitoleico disminuyó ~32%. Los índices de ácido graso monoinsaturado/saturado, que estiman indirectamente la actividad de SCD, decrecieron concomitantemente en las células hSCDas- respecto de su grupo control. A diferencia de las células transformadas con SV40 (hSCDas-A), el porcentaje de los otros ácidos

grasos saturados y monoinsaturados se mantuvo constante, debido probablemente a la menor reducción en la actividad SCD en este modelo celular. Al igual que en las células hSCDas-A, el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados se incrementó.

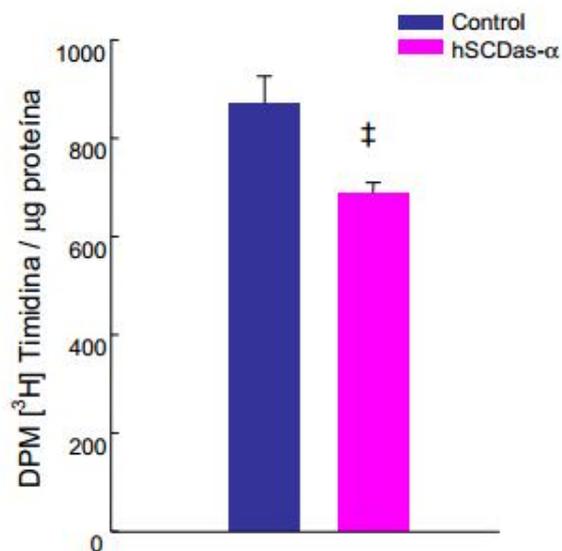
Este resultado sugiere que una deficiencia de ~20% en la actividad de SCD fue suficiente para inducir un cambio en la composición de los lípidos celulares en el modelo celular de carcinoma A549.

Ácidos grasos (%)	Control	hSCDas-
14:0	2.24 ± 0.20	2.10 ± 0.94
16:0	24.33 ± 0.57	24.31 ± 2.33
16:1 n-7	14.53 ± 0.40	9.91 ± 0.70 *
18:0	12.02 ± 0.38	15.14 ± 1.10 †
18:1 n-9	32.61 ± 0.76	32.58 ± 1.86
18:1 n-7	7.78 ± 0.81	7.14 ± 0.15
18:2 n-6	2.62 ± 0.08	4.36 ± 0.48 ‡
20:4 n-6	3.86 ± 0.23	4.47 ± 0.45 ‡
16:1 n-7 / 16:0	0.60 ± 0.01	0.39 ± 0.01 *
16:1 n-7 + 18:1 n-7 / 16:0	0.92 ± 0.04	0.66 ± 0.03 *
18:1 n-9 / 18:0	2.71 ± 0.06	2.05 ± 0.03 *
MUFA / SFA	1.51 ± 0.02	1.09 ± 0.06 *

Tabla 3: Distribución porcentual de los ácidos grasos de los lípidos totales en las células A549 hSCDas- y controles. Los lípidos celulares se extrajeron por el método de Blight & Dyer y los ésteres metílicos derivados de sus ácidos grasos constituyentes se analizaron por GLC. Los valores representan la media ± SD de triplicados. * p< 0.001, ‡ p< 0.01, † p< 0.05. t-test

La proliferación celular, estimada por la marcación del ADN con [3H] timidina, también disminuyó significativamente (~21%) en esta línea deficiente en SCD respecto de las células transfectadas con el vector vacío (Figura 19).

Figura 19: Síntesis de ADN en las células A549 hSCDas y controles. Células preconfluentes de ambos grupos experimentales se incubaron con [³H] timidina durante 2 hs. La incorporación de timidina al ADN se determinó por conteo de centelleo líquido y se estandarizó al contenido proteico. Los valores representan la media ± SD de triplicados. ‡ p< 0.01. t-test



Este resultado sugiere que, al igual que lo observado en las células transformadas con SV40, la SCD es necesaria para sostener la proliferación celular de la línea A549.

11. La deficiencia de SCD incrementa el período de latencia y disminuye el crecimiento tumoral de las células A549 en ratones “*nude*”

Dada la disminución de la incorporación de [³H]timidina, un estimador de la proliferación celular, en las células A549 hSCDas-, nos preguntamos si la deficiencia en SCD podría alterar el crecimiento celular *in vivo* de esta línea celular.

Hipótesis: La disminución en la actividad de la 9-desaturasa reducirá el crecimiento celular *in vivo* de las células de carcinoma humano A549.

Diseño experimental: Los ratones *nude* se dividieron aleatoriamente en grupos de cinco animales cada uno y se inocularon subepidérmicamente con $1-1.6 \times 10^6$ células A549 controles (transfectadas con el vector vacío) o A549 hSCDas- en el espacio interescapular. Semanalmente se midió a los tumores y se determinó su volumen relativo, como se describe en *Materiales y métodos*.

Resultados: El 100% de los ratones inoculados con las células A549 controles desarrollaron tumores a los 15 días (n=5). En los ratones inoculados con las células deficientes en SCD el tiempo de latencia fue ~4 veces mayor. Así, dos de los cinco ratones portadores de A549 hSCDas- desarrollaron tumor a los ~60 días de la

inoculación. A los 100 días cuatro de los cinco ratones presentaban tumor. Un ratón inoculado con las células hSCDas- no desarrolló tumor ni aún después de 150 días desde la inoculación. En un experimento independiente los resultados fueron similares para ambos grupos de ratones, y en este caso 2 de los 5 ratones inoculados con las células A549 deficientes en SCD no desarrollaron tumores después de 150 días. También en este experimento el 100% de los ratones inoculados con las células control presentaron tumores a los 15 días de la inoculación.

Como se observa en la Figura 20, el crecimiento relativo de los tumores también mostró diferencias. Los tumores provenientes de las células hSCDas- crecieron más lentamente que los controles a partir de los ~20 días desde su aparición, siendo esta diferencia estadísticamente significativa a partir de los 28 días. El tiempo de duplicación del volumen tumoral, calculado a partir del promedio de dos experimentos independientes, fue de 9.2 ± 0.27 días para aquellos provenientes de las células A549 controles y de 13.4 ± 1.7 días para los de las células A549 deficientes en SCD ($p < 0.001$ t-test; para un total de 10 ratones control y 6 ratones A549 hSCDas-).

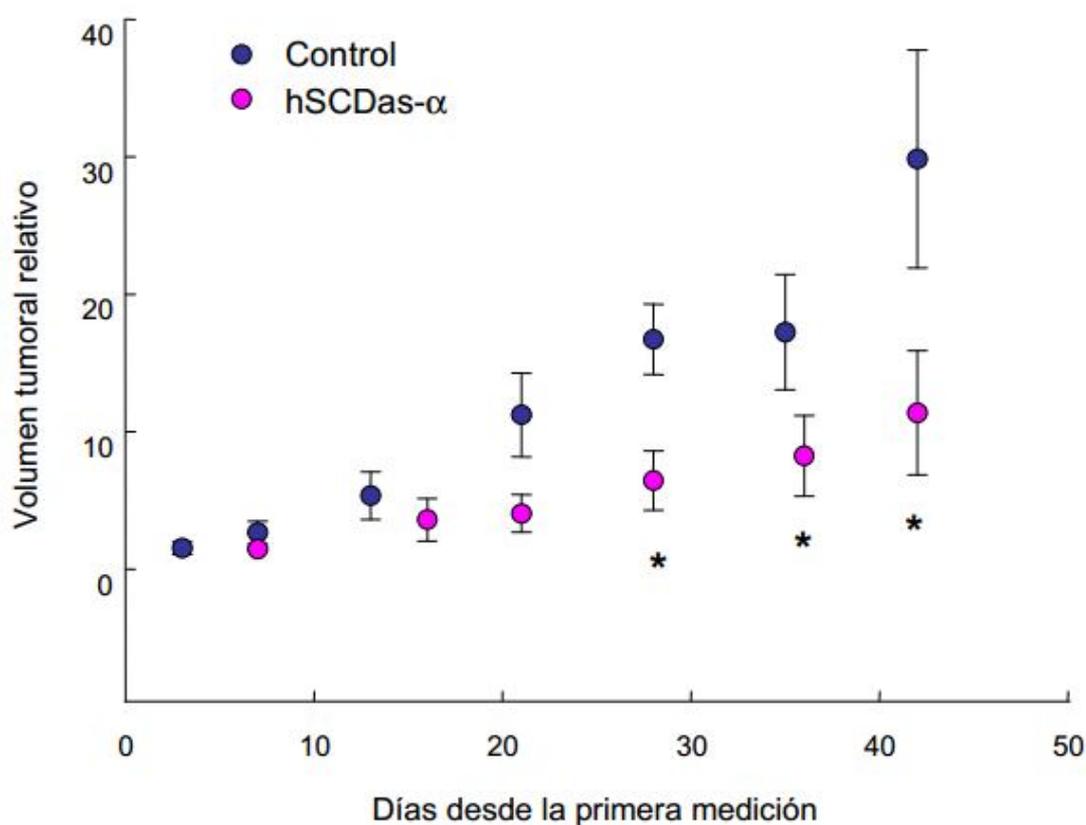


Figura 20: Crecimiento relativo de los tumores provenientes de las células A549 hSCDas- α y controles. 1.6×10^6 células A549 controles o deficientes en SCD se inocularon subepidérmicamente en ratones nude. Los tumores se midieron semanalmente con calibre y su volumen se calculó a partir de la fórmula de un elipsoide. El volumen tumoral se estandarizó a su volumen inicial. Los valores representan la media \pm SD. N=5 para el grupo control y N=4 para el grupo inoculado con A549 hSCDas- α . * $p < 0.05$ ANOVA

Estos experimentos sugieren fuertemente que la SCD interviene en la regulación de la proliferación *in vivo* de células neoplásicas humanas.

Discusión

La esteroil-CoA desaturasa (SCD), enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, ha sido vinculada generalmente al metabolismo de los lípidos de reserva y lipoproteínas en roedores, y existen numerosos estudios de su función y regulación en hepatocitos, adipocitos y glándulas de la piel (revisado por *Miyazaki y Ntambi*, 2003). Sin embargo, poco es lo que se conoce de la función de esta enzima en otras células y tejidos, especialmente en el ser humano. La alta expresión y actividad de la SCD, en conjunto con un aumento en el contenido de MUFA, en diversos tumores nos llevó a preguntarnos cuál era la importancia de esta enzima en el desarrollo y progresión del cáncer. El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer la relación de la SCD y el fenotipo celular transformado. Hipotetizamos que la SCD es esencial para mantener el fenotipo celular transformado debido a la importancia de esta enzima en la síntesis de membranas celulares. Más aún, la SCD podría ejercer un rol regulador de la muerte celular programada mediante la prevención de este fenómeno al transformar los ácidos grasos saturados (potencialmente citotóxicos) en sus derivados monoinsaturados más inocuos. Para poner a prueba estas hipótesis se estableció un modelo celular de disminución de la expresión de la SCD mediante la transfección estable del gen de la SCD humana en orientación antisentido en una línea celular derivada de fibroblastos de pulmón humano transformadas con el oncovirus SV40 (SV40-WI38). Cabe destacarse que las células SV40-WI38 exhiben una elevada expresión de SCD en concordancia con una muy activa síntesis de lípidos de membranas (*Scaglia*, 2005).

Así, la transfección estable de las células SV40-WI 38 con un segmento del cADN de la SCD humana en posición antisentido conllevó a una disminución significativa de la expresión y, consecuentemente, de la actividad de la SCD. Este resultado concuerda con trabajos previos en los que se observó que el nivel de la 9-desaturasa, que es el componente terminal de esta cadena de transporte de electrones, es el que determina la tasa total de desaturación microsomal y es el que está sometido a regulación hormonal (*Prasad*, 1979; *Kasturi*, 1982). La reducción en la actividad de la SCD en las células transformadas con SV40 se tradujo en una disminución del índice MUFA/SFA tanto en los fosfolípidos de membrana como en los TAG y FFA, sugiriendo que la SCD es el principal regulador de la composición de los ácidos grasos en estas células. Más aún, la actividad de la SCD en distintas poblaciones clonales de células hSCDAs se correlacionó con el contenido de MUFA. La importancia de la SCD en la regulación del contenido de MUFA celulares se acentúa al considerar que las modificaciones en el perfil de ácidos grasos persistieron incluso cuando las células se cultivaron en medio suplementado con suero fetal bovino, el cual tiene cantidades significativas de MUFA.

Además de las alteraciones en el perfil de ácidos grasos de las principales especies de fosfolípidos celulares, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, la síntesis de fosfolípidos disminuyó significativamente en las células deficientes en SCD. Esta observación sugiere que la actividad de SCD es importante no sólo para la remodelación de fosfolípidos preexistentes sino también para la síntesis *de novo* de los mismos. Adicionalmente, en las células hSCDas hubo una marcada reducción de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, que podría relacionarse a la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa, enzima que cataliza la reacción limitante de la velocidad de síntesis de ácidos grasos, por la acumulación de su inhibidor, el palmitoil-CoA (sustrato de la SCD). En este sentido, *Dobrzyn et al.* (2004) reportaron que ratones SCD1^{-/-} exhiben una marcada disminución en la actividad hepática de la acetil-CoA carboxilasa y de su producto, el malonil-CoA, el cual es requerido para la síntesis de ácidos grasos. En este modelo, aumenta consecuentemente la - oxidación de los ácidos grasos ya que el malonil-CoA inhibe a la enzima carnitina-palmitoiltransferasa 1, la cual regula el pasaje de los acil-CoA hacia la mitocondria para su degradación. En nuestro modelo de deficiencia de SCD no podemos descartar que exista un aumento en la -oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, el hecho de que la marcación radioactiva a partir de ácidos grasos exógenos no difirió entre las células hSCDas-A y el grupo celular control, podría ser un indicador de que la oxidación de los ácidos grasos no se vio alterada. Más allá del mecanismo involucrado, la deficiencia en el contenido de ácidos grasos endógenos puede explicar la menor formación de fosfolípidos *de novo* observada en las células hSCDas por la carencia de los ácidos grasos sustratos correspondientes. Por otra parte, la síntesis de colesterol, otro de los componentes principales de las membranas celulares y cuya síntesis no comparte reacciones enzimáticas comunes con la producción de fosfolípidos, también se redujo notablemente en las células deficientes en SCD. Esta observación indica fuertemente que la SCD está involucrada en la regulación de la síntesis de membranas. Ya en 1980, *Cornell y colaboradores* reportaron que la inhibición de la síntesis de esteroides disminuye la síntesis de fosfolípidos y viceversa, postulando una coordinación en la síntesis de lípidos de membranas. Más recientemente, se publicó que distintos factores de crecimiento celular estimulan la producción de membranas celulares mediante la inducción de enzimas relacionadas a la síntesis de ácidos grasos y colesterol en fibroblastos humanos y murinos (*Demoulin, 2004*). La depleción de SCD, al privar de sustratos necesarios para la síntesis de fosfolípidos, podría alterar consecuentemente el metabolismo del colesterol. Adicionalmente, la SCD podría modificar las propiedades de la membrana plasmática y, en consecuencia, el eflujo/influjo o reciclado del colesterol (*Simons, 2000b*). En este sentido, se ha visto que el aumento de los dominios fluidos de membrana (dado por la sobreexpresión de la SCD1) altera el eflujo celular de colesterol, sin modificar sin embargo el contenido total de colesterol y fosfatidilcolina (*Sun, 2003*). Asimismo la internalización y distribución de

análogos lipídicos a las vesículas intracelulares (endosomas, lisosomas, etc.), involucradas en el reciclado de lípidos de membrana, se vio alterada con la depleción del colesterol y/o la sobreexpresión de la 9-desaturasa murina (Hao, 2004). Estos trabajos sugieren que la SCD podría estar involucrada en el control del metabolismo del colesterol a través de modificaciones de los dominios de membrana.

En condiciones normales, el contenido de fosfolípidos celulares no varía. Incluso cuando se sobreexpresa la enzima que regula la síntesis de fosfatidilcolina (CTP:fosfocolina citidililtransferasa) y aumenta la síntesis de este fosfolípido, el contenido de fosfolípidos celulares se mantiene constante debido a un aumento en su degradación (Baburina, 1999). Análogamente, en las células que subexpresan el gen de la SCD no observamos cambios en el contenido de los fosfolípidos celulares a pesar de la disminución en la síntesis de los mismos.

Así como la masa de lípidos de membranas debe permanecer dentro de límites estrechos para mantener la viabilidad celular, la distribución de ácidos grasos en estos lípidos ha de estar precisamente regulada. Se ha postulado que la composición de los ácidos grasos de las membranas es esencial para mantener las características físico-químicas de las mismas así como la actividad de proteínas asociadas a ella (revisado por Spector, 1985 y Clandinin, 1991). Se puede especular entonces que exista algún mecanismo celular para mantener la homeostasis en los fosfolípidos de membrana y segregar el exceso de alguna especie de ácido graso hacia un "pool" de lípidos más expandible e inerte desde el punto de vista funcional, como es el caso de los TAG. Así, en las células que subexpresan el gen de la SCD observamos que el ácido [14C]esteárico exógeno (18:0) fue vehiculizado diferencialmente hacia los TAG.

Más aún, el contenido de TAG se observó aumentado en estas células gracias a un incremento en la masa de SFA, mientras que los MUFA no varían significativamente. El ácido [14C]oleico exógeno (18:1 n-9), por otra parte, se incorporó en mayor medida en los fosfolípidos de las células hSCDAs y fue excluido de los TAG. Estos resultados apoyan la idea de una segregación diferencial de los distintos ácidos grasos y podrían explicar por qué la magnitud de los cambios en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos no fue tan acusada como la que se esperaría con una disminución del 70% de la actividad de la SCD.

El "knockdown" de la expresión de SCD en las células transformadas SV40 promovió notables cambios en la proliferación celular. La tasa de crecimiento celular disminuyó considerablemente, lo que se tradujo en un aumento del tiempo de duplicación poblacional aproximadamente 65% mayor que el de las células SV40 transfectadas con el vector vacío. Es interesante notar que la proliferación celular fue proporcional a la actividad de SCD en tres poblaciones clonales que subexpresaron en distinta medida el gen de la SCD, lo que

sugiere una estrecha relación entre la SCD y el crecimiento celular. El aumento del tiempo de duplicación poblacional podría estar relacionado a la menor tasa de síntesis de fosfolípidos ya que de este modo se incrementaría el tiempo necesario para duplicar la masa de estos lípidos formadores de membranas. Consecuentemente, la generación de organelas y de los sistemas de endomembranas, así como de la membrana plasmática, las cuales deben ser duplicadas previamente a la división celular, estaría significativamente restringida.

La suplementación del medio de crecimiento con el principal producto de la SCD, el ácido oleico, no revirtió la menor proliferación de las células hSCDas lo que sugiere que los MUFA producidos endógenamente tienen un destino metabólico distinto que los MUFA exógenos y son esenciales para el crecimiento celular, al menos en este modelo experimental. De igual manera, los cambios metabólicos del hígado de ratones deficientes en SCD1 (*scd1^{-/-}*) no revirtieron con una dieta lipogénica suplementada con ácido oleico (Miyazaki, 2001b), lo que refuerza el concepto de la presencia de mecanismos de segregación funcional de ácidos grasos dependiendo de su ruta de ingreso al metabolismo de lípidos. Se podría hipotetizar que los MUFA sintetizados endógenamente por la SCD son más asequibles a otras enzimas del metabolismo lipídico ubicadas también en el retículo endoplásmico, como la glicerol-3-fosfato aciltransferasa microsomal y la CTP:fosfolina citidililtransferasa, entre otras. A su vez distintas proteínas que unen ácidos grasos o derivados, como las proteínas de unión a ácidos grasos o a acil-CoA, podrían jugar un papel importante en la segregación de distintos "pools" de ácidos grasos (Knudsen, 2000; Haunerland, 2004).

Los estudios aquí presentados proveen evidencia de una función de la SCD no descrita hasta el momento: la regulación de la muerte celular programada en células humanas. Así, se observó que la disminución en la SCD provocó notables cambios en la viabilidad celular. La muerte celular programada se incrementó significativamente en las células hSCDas aún en condiciones estándares de cultivo, sugiriendo que esta enzima es esencial para la supervivencia celular. Asimismo, los mecanismos que llevan a la apoptosis en la depleción de SCD permanecen desconocidos. Se ha postulado que, en tejidos no adiposos, un aumento de los niveles de TAG *per se* o bien el aumento de los FFA provenientes de la hidrólisis de los TAG promueve la muerte celular. Los FFA, especialmente los saturados, pueden inducir apoptosis mediante la generación de ceramidas (Paumen, 1997; Maedler, 2001), la disrupción de la membrana mitocondrial interna (Hardy, 2003), y la generación de especies reactivas de oxígeno (Listenberger, 2001), entre otros posibles mecanismos. El aumento en la masa de FFA y TAG, a su vez enriquecidos con SFA, inducida por la deficiencia en SCD probablemente sean los factores que determinan el aumento de la muerte celular en este modelo experimental.

Además de los mencionados anteriormente, otros mecanismos podrían estar

involucrados en la inducción de muerte celular en las células hSCDas. Por ejemplo, el aumento crónico de los FFA podría ser responsable de la perturbación de las membranas celulares, debido a su efecto de detergente. Alternativamente, se ha reportado que células incubadas con ácido palmítico tienen incrementado el contenido de TAG con dos o tres ácidos grasos saturados. En estas condiciones los TAG forman estructuras intracelulares sólido-cristalinas a 37°C, que pueden comprometer la viabilidad celular (*Urade, 1982*). Si bien estos efectos no pueden ser descartados, alteraciones tan profundas en las estructuras celulares serían probablemente más compatibles con un fenómeno de citotoxicidad masiva, el cual no se produce en nuestro modelo celular en condiciones de crecimiento regulares.

Por otra parte, el incremento de la actividad de caspasas indica que la muerte celular se produce por apoptosis en nuestro modelo de deficiencia de SCD. El incremento de los ácidos grasos saturados, precursores de la síntesis de ceramidas, hacía de este lípido proapoptótico un candidato fuerte para explicar la inducción de apoptosis en las células hSCDas. El contenido de ceramidas, no obstante, no se vio alterado por la disminución de la SCD, indicando que este mediador lipídico no está comprometido en estas condiciones.

La importancia de la SCD en la viabilidad celular es doble ya que también está involucrada en la protección celular contra la sobrecarga de SFA. Así, las células hSCDas fueron más susceptibles a la apoptosis inducida por el exceso de ácido palmítico exógeno. Este resultado apoya trabajos previos en los que se observó que las células CHO que sobrepresaban el gen de la SCD1 son más resistentes a la citotoxicidad del ácido palmítico exógeno que las células CHO transfectadas con el vector de expresión vacío (*Listenberger, 2003*). En nuestro modelo, a diferencia de las células CHO, sólo altas concentraciones de FFA, dadas por una relación FA:BSA elevada, indujeron muerte celular más allá del nivel basal.

Asimismo, nuestros resultados concuerdan con un efecto diferencial de los distintos ácidos grasos en relación a la citotoxicidad celular, como fuera descrito por otros autores (*de Vries, 1997; Hardy, 2000; Maedler, 2001; Ulloth, 2003; Mishra, 2005*). Así, el ácido oleico (18:1 n-9), a diferencia del ácido palmítico (16:0), no indujo un aumento en la apoptosis ni a concentraciones muy elevadas (750 M). Estos resultados descartan un efecto de detergente, el cual sería indistinto para diferentes ácidos grasos. Más aún, el ácido oleico ejerció un efecto preventivo de la muerte celular inducida por el ácido palmítico. Sin embargo, la incubación de las células con concentraciones de hasta 750 M de este ácido graso monoinsaturado, principal producto de la SCD, no revirtió el incremento basal de apoptosis en la línea deficiente en SCD. Nuevamente, los datos aquí reportados respaldan la idea de una función diferencial de los ácidos grasos sintetizados endógenamente.

La alteración de la proliferación y/o de la muerte celular es una característica distintiva

de las células transformadas, como es el caso de las células SV40-WI38. Otra característica común a estas células es su independencia de anclaje para proliferar (*Bagnato, 2003*). Las células SV40 deficientes en SCD, a diferencia de las células controles transfectadas con el vector vacío, no formaron colonias multicelulares al ser cultivadas sobre un sustrato semisólido. Esta observación revela el carácter esencial de la actividad de la SCD para el crecimiento independiente de anclaje de las células transformadas. Más aún, el hecho de que esta restricción del crecimiento persistió aún en presencia de ácido oleico en el medio extracelular refuerza la noción de que la síntesis de MUFA es imprescindible para sostener el fenotipo celular transformado de las células SV40-WI 38.

Quizás la propiedad más relevante, desde el punto de vista patológico, de las células transformadas es su capacidad de generar tumores cuando son inoculadas en un modelo animal apropiado. A fin de estudiar el impacto de la deficiencia de SCD sobre la formación de tumores, se utilizó la misma estrategia de ADN antisentido que en las células SV40-WI 38, en una línea celular derivada de un adenocarcinoma de pulmón humano, la línea A549. Las células A549 transfectadas establemente con el cADN de la SCD en posición antisentido mostraron una reducción significativa de la actividad 9-desaturasa respecto de la línea control (células A549 transfectadas con el vector vacío). Aunque la disminución en la actividad de la SCD en las células A549 fue menor que la de las células SV40-WI 38 hSCDas, este cambio fue suficiente para alterar notablemente el perfil de ácidos grasos celulares, lo que indica que la SCD es el regulador primario del balance de MUFA y SFA no solamente en las células sujetas a transformación oncoviral, sino también en células neoplásicas originadas de tumores. Asimismo, al igual que en las células hSCDas derivadas de la línea SV40-WI 38, la incorporación de [14C]ácido esteárico en TAG aumentó significativamente y la síntesis de ADN disminuyó en las células A549 deficientes en SCD. En conjunto, estos datos son relevantes en dos aspectos. Primero, sugieren que las modificaciones metabólicas observadas en la línea transformada con SV40, debidas a la deficiencia de SCD, no son exclusivas de este modelo celular y que podrían ser generales a otros tipos celulares. Segundo, la magnitud de estos cambios en ambos modelos celulares, principalmente en la proliferación celular, se correlaciona con el nivel de expresión de SCD, sugiriendo un estrecho vínculo entre estas variables.

En concordancia con los datos de proliferación celular *in vitro*, los ratones inoculados subepidérmicamente con las células A549 controles desarrollaron tumores medibles a los ~15 días, mientras que en los roedores portadores de células A549-hSCDas los tumores comenzaron a aparecer después de 2 meses desde la inoculación. Por consiguiente, la depleción de la SCD incrementó significativamente el tiempo de latencia de los tumores. Más aún, la tasa de crecimiento relativo de los tumores provenientes de las células hSCDas disminuyó significativamente. Estos resultados sugieren fuertemente que la SCD interviene

en la regulación del crecimiento neoplásico *in vivo*.

Sin bien todavía no podemos explicar cómo la reducción de la SCD afecta la proliferación y muerte celular, algunas hipótesis pueden ser propuestas.

Es probable que al menos algunas alteraciones del crecimiento celular de las células deficientes en SCD se deban a la disminución de la síntesis de lípidos de membranas. La síntesis de fosfatidilcolina (PC), el fosfolípido más abundante de las membranas celulares, está coordinada con el ciclo celular y es necesaria para la progresión del mismo (*Jackowski, 1994; Tercé, 1994*). La disminución de esta ruta biosintética induce apoptosis en diversos modelos celulares (*Cui, 1996; Yen, 1999; Miquel, 1998*). Más aún, de la enzima limitante de la velocidad de síntesis de PC (CTP:fosfocolina citidililtransferasa) es el blanco de distintos agentes antineoplásicos y los efectos citotóxicos de los mismos revierten con el agregado de lisoPC o la sobreexpresión de esta enzima, lo que indica que el producto final de la vía, la PC, es indispensable para la supervivencia celular (*Finney, 2000; Boggs, 1995; Baburina, 1998*).

A diferencia de la mayoría de las células normales (con excepción de los adipocitos, hepatocitos y células glandulares) distintos tipos de células tumorales exhiben altos niveles de expresión y actividad de la enzima ácido grasos sintasa, siendo la síntesis endógena de ácidos grasos vital para la supervivencia celular (*Kuhajda, 1994; Welsh, 2001; Camassei, 2003; Gabrielson, 2001; Rossi, 2003; Takahiro, 2003*). Así, la reducción de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, por inhibición de la ácido graso sintetasa, disminuye el crecimiento de células neoplásicas *in vitro* e *in vivo*, induce apoptosis y retarda la aparición de tumores (*Kuhajda, 1994 y 2000; Pizer, 2000; Zhou, 2003; Gabrielson, 2001; Kridel, 2004; Alli, 2005*).

En este sentido, la disminución del crecimiento de las células deficientes en SCD puede por tanto deberse a la disminución de la síntesis de ácidos grasos y, consecuentemente, de fosfolípidos necesarios para la formación de membranas celulares. Es importante destacar que trabajos recientes han vinculado la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos en células tumorales a las vías de señalización dependientes de PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-kinasa/proteína quinasa B) y/o MAPK (proteína kinasas activadas por mitógenos) y al factor de transcripción SREBP-1 (proteínas de unión a elementos regulados por esteroides), el cual regula la expresión de múltiples genes lipogénicos (*Yang, 2002; Van de Sande, 2002; Kawada, 2002; Ettinger, 2004; Wang, 2005; Alli, 2005*). *Yang y colaboradores (2002)* han reportado que la expresión de la enzima ácido graso sintetasa y la síntesis de ácidos grasos en distintas células transformadas y tumorales dependen de la inducción de la expresión y maduración de SREBP-1 por las vías de señalización dependientes de PI3K/Akt y MAPK. Más aún, las MAPK Erk1 y 2 son capaces de fosforilar *in vitro* a SREBP-1a y 2, por lo que podrían estar implicadas en otro tipo de regulación postranscripcional de estos factores de transcripción (*Roth, 2000; Kotzka, 2000*). De esta forma, podrían relacionarse la síntesis de lípidos con la inducción de la proliferación celular, ya que las vías PI3K/Akt y MAPK

contribuyen con ambos procesos. Incluso se propuso recientemente que, en células de carcinoma de ovario, la inhibición de la enzima ácido graso sintetasa disminuye el contenido de Akt fosforilada (activa), por lo que existiría un “*feedback*” positivo entre estas enzimas (Wang, 2005). Sin embargo, el ácido palmítico (principal producto de la ácido graso sintetasa) inhibe la actividad de la PI3K en células de cáncer de mama e induce apoptosis (Hardy, 2000). Este efecto del ácido palmítico sobre la vía de PI3K/Akt también se observó en células musculares (Storz, 1999; Cazzoli, 2001). El ácido oleico, contrariamente, estimula la proliferación celular y previene la apoptosis inducida por ácido palmítico por medio, al menos en parte, de la activación de PI3K (Hardy, 2000 y 2005). Se puede hipotetizar entonces que los cambios en MUFA y SFA promovidos por la deficiencia de SCD podrían disminuir la señalización por PI3K/Akt y consecuentemente los niveles de SREBP-1, reduciendo la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos fundamentales para mantener una activa división celular. Alternativamente, el aumento de PUFA de las células hSCDas, compensatoria de la menor abundancia relativa de MUFA, podría disminuir en forma directa la transcripción y procesamiento de SREBP (Hannah, 2001). En favor de esta hipótesis, el mRNA de SREBP-1, así como el de las enzimas lipogénicas ácido graso sintetasa y glicerol fosfato acil-CoA transferasa, se observan reducidos en hígado de ratones *scd1*^{-/-} (Ntambi, 2002).

Si bien la vía de señalización a través de PI3K y Akt es la más atractiva debido a que está relacionada al control de la apoptosis/proliferación y a la síntesis de lípidos, otras cascadas podrían estar alteradas en este modelo celular de deficiencia crónica de SCD. Se sabe desde hace algún tiempo que los ácidos grasos *cis*-insaturados activan prácticamente todas las isoformas de PKC (proteína kinasa C) (Murakami, 1986; Shinomura, 1991; Khan, 1993; Nishizuka, 1995). Se ha reportado que el efecto mitogénico del ácido oleico depende de la activación de PKCs en células musculares lisas (Lu, 1996 y 1998). Sin embargo, se desconoce la relación entre los ácidos grasos producidos endógenamente y estas cascadas de señalización.

También se puede especular que, al alterar la relación MUFA/SFA, la deficiencia en SCD puede promover cambios en las propiedades de las membranas y, consecuentemente, en proteínas asociadas a ellas que podrían intervenir en los eventos de crecimiento y muerte celular. Se ha reportado un incremento de la fluidez de membrana en células tumorales y transformadas (Barnett, 1974; Sok, 1999 y 2002). Las células SV40-WI38 también exhiben membranas más fluidas que la línea celular normal WI38 de la cual derivan (Scaglia, 2005). Si bien no se conocen en detalle las causas o las implicancias biológicas de la modificación de la fluidez de las membranas en las células transformadas, existen trabajos que vinculan la alteración de la fluidez al transporte de drogas a través de la membrana plasmática

(Sinicrope, 1992) y a la capacidad de invasión y tumorigenicidad celular (McDonnel, 2003). En este último trabajo, la rigidización de las membranas celulares también se acompañó de una disminución en la formación de colonias multicelulares sobre una matriz de colágeno. De este modo, la supresión del crecimiento independiente de anclaje en las células deficientes en SCD podría estar relacionada a cambios en la fluidez de membrana. Más aún, Sun y colaboradores (2003) observaron que la sobreexpresión de la SCD1 murina produjo importantes cambios en los dominios de membrana. Notablemente, en este reporte los cambios en el contenido total de ácidos grasos saturados e insaturados fueron similares en magnitud, aunque en sentido inverso, a los observados en el presente trabajo en las células hSCDas. Aunque el presente trabajo no incluyó el análisis de la estructuración de las membranas, sería particularmente interesante estudiar en el futuro el papel de la SCD en la regulación de los dominios de membrana y los procesos celulares asociados a ellos.

Adicionalmente, es posible que la subexpresión de la SCD produzca otras alteraciones con profundas implicancias en el crecimiento celular *in vivo*. En efecto, el gran incremento en el tiempo de latencia de los tumores de las células deficientes en SCD en relación a la baja disminución de la proliferación de esta línea *in vitro*, indica que alguna otra característica asociada a la deficiencia de la SCD podría estar involucrada. Uno de los procesos que podría estar modificado es la angiogénesis. En este sentido, se reportó que el ácido oleico, así como otros ácidos grasos insaturados, induce la autofosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico, y la consecuente cascada de señalización mitogénica, en células endoteliales humanas (Vacaresse, 1999). Adicionalmente, el ácido oleico promueve la proliferación y migración de otras células vasculares, como los miocitos (Lu, 1996 y 1998; Askari, 2002; Greene, 2001). En cambio, el ácido saturado esteárico, y los ácidos grasos poliinsaturados a mayores concentraciones, promueve la apoptosis de células endoteliales (Artwohl, 2003). Por otra parte, también se ha reportado que el ácido esteárico inhibe la adhesión a laminina y la invasión *in vitro* (Singh, 1995). Estos trabajos podrían sugerir una relación entre la SCD, la angiogénesis y la invasión celular. Sin embargo, los mismos se realizaron mediante la adición de ácidos grasos exógenos y, como se discutiera anteriormente, el destino metabólico de los distintos ácidos grasos puede ser diferente dependiendo de su origen. Futuras investigaciones con nuestro modelo celular de deficiencia de SCD podrían ayudar a dilucidar el papel de esta enzima en los mencionados procesos.

La relación entre la SCD y el desarrollo neoplásico necesita de estudios adicionales. Será interesante, en este sentido, utilizar otros modelos de células tumorales a fin de evaluar el papel de la SCD en células provenientes de distintos tejidos, con diferencias en el metabolismo lipídico y con diversos comportamientos biológicos. Asimismo, estudios futuros permitirán discernir la función de la SCD *per se* o como parte de la síntesis concertada de lípidos en modelos tumorales. En este sentido, es sugerente que la expresión de SCD está incrementada aún en células de cáncer de mama que no muestran un aumento en la

expresión de la ácido grasos sintetasa (*Kumar-Sinha, 2003*).

Por otra parte, la función de la SCD en la proliferación de células normales y la progresión del ciclo celular deberá ser objeto de análisis en el futuro. De los distintos genes lipogénicos cuya expresión se indujo por el factor de crecimiento derivado de plaquetas en fibroblastos humanos, el de la SCD es el que mostró mayor incremento (*Demoulin, 2004*). El índice MUFA/SFA se alteró consecuentemente. Es dable hipotetizar entonces que el aumento de los MUFA pueda jugar un papel importante en la progresión del ciclo celular. El incremento de la fluidez de la membrana plasmática podría ser necesario para permitir las modificaciones morfológicas de las células en división (redondeamiento inicialmente y constricción durante la citoquinesis).

A continuación se presenta un resumen de los cambios que observamos en las células deficientes en SCD respecto de la línea SV40-WI 38 control y un modelo de cómo estos podrían alterar el crecimiento celular.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (*Scaglia, 2005*) han mostrado que la transformación con SV40 de la línea celular WI 38 conlleva a un aumento en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) mediante la activación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la actividad de la SCD con un consecuente aumento en el contenido de MUFA en los fosfolípidos celulares (Figura 21 A). Concomitantemente con la alteración del perfil de ácidos grasos, las células SV40-WI 38 muestran un incremento en la fluidez de membrana. A su vez, la tasa de síntesis de fosfolípidos y colesterol están incrementadas en las células SV40-WI 38 respecto de la línea normal WI 38 (*Howard, 1969*), probablemente para sostener la alta tasa de proliferación celular. La deficiencia en SCD (Figura 21 B) disminuye el índice de desaturación (MUFA/SFA) en los fosfolípidos celulares, produciendo probablemente una rigidización de las membranas celulares. Como resultado de la disminución de la síntesis de MUFA endógenos, la incorporación de ácido oleico exógeno en los fosfolípidos se incrementa en las células hSCDas. Sin embargo, esto no alcanza para compensar el incremento de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de membrana. La depleción de la SCD reduce asimismo la síntesis de fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolina, y de colesterol. Estos cambios en la tasa de síntesis y las características de las membranas podrían resultar en la disminución de la proliferación celular y el crecimiento independiente de anclaje observados en las células hSCDas. Adicionalmente, la acumulación de los SFA podría inhibir la síntesis *de novo* de ácidos grasos, pero los “pooles” de FFA y TAG se expanden debido a la canalización preferencial de los SFA hacia estas fracciones lipídicas. Debido a la naturaleza altamente saturada tanto de los FFA como de los TAG, estos lípidos podrían promover efectos citotóxicos y desencadenar la apoptosis.

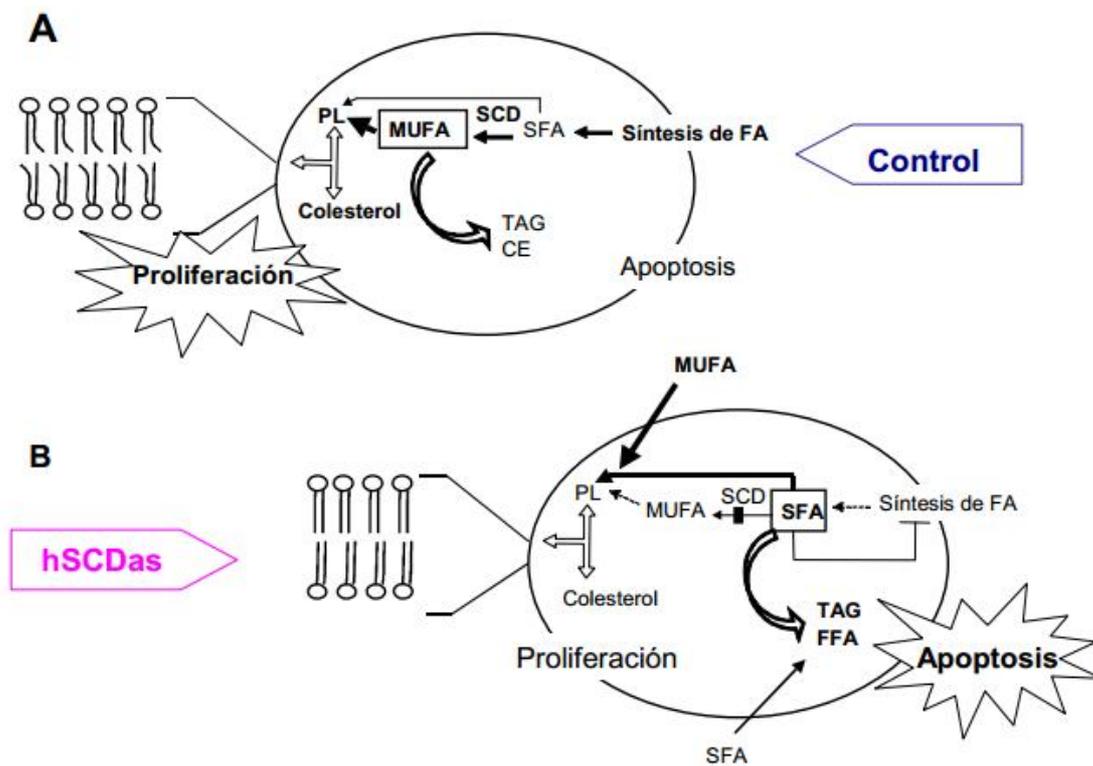


Figura 21: Modelo hipotético de la regulación de la apoptosis y proliferación por la SCD en las células transformadas con SV40.

Conclusión

Los resultados aquí presentados sugieren fuertemente que, al menos en los modelos experimentales utilizados, la SCD interviene en la regulación de la síntesis de lípidos, la apoptosis y la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*. Bajo estas condiciones, la síntesis endógena de ácidos grasos monoinsaturados adquiere el carácter de “esencial” para mantener el fenotipo celular transformado.

Estudios ulteriores permitirán establecer los mecanismos por los cuales la deficiencia de SCD conlleva a las alteraciones fenotípicas descritas en este trabajo. La vía de señalización PI3K/Akt y el factor de transcripción SREBP, así como la estructuración de los dominios de membrana, son “blancos” posibles de la SCD.

Notas

¹ Se utilizaron las abreviaturas más empleadas en la bibliografía de forma tal de facilitar la comprensión del lector.

² *Lehninger y col.* Principios de Bioquímica, Ediciones Omega S.A. (2^o Edición)

³ *Futuyama D.*, 1986, *Evolutionary biology*. Sinaver Ass. Sunderland, Massachuctts, 2^o Edición, pp. 149-183.

⁴ Cuando se iniciaron estos estudios se conocía la existencia de sólo una isoforma de SCD humana.

Referencias

- Alli P.M, Pinn M.L, Jaffee E.M, McFadden J.M, Kuhajda F.P. Fatty acid synthase inhibitors are chemopreventive for mammary cancer in neu-N transgenic mice. *Oncogene*, 2005, **24**(1):39-46.
- Anthony M.L, Zhao M, Brindle K.M. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem.*, 1999, **274**(28):19686-92.
- Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer S.M. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J.*, 2004, **18**(1):146-8.
- Askari B, Carroll M.A, Capparelli M, Kramer F, Gerrity R.G, Bornfeldt K.E. Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 2002, **277**(39):36338-44.
- Baburina I, Jackowski S. Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem.*, 1998, **273**(4):2169-73.
- Baburina I, Jackowski S. Cellular responses to excess phospholipid. *J Biol Chem.*, 1999, **274**(14):9400-8.
- Bagnato C, Igal R.A. Overexpression of diacylglycerol acyltransferase-1 reduces phospholipid synthesis, proliferation, and invasiveness in simian virus 40-transformed human lung fibroblasts. *J Biol Chem.*, 2003, **278**(52):52203-11.
- Barcellos-Hoff M.H, Ravani S.A. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res.*, 2000, **60**(5):1254-60.
- Barnett R.E, Furcht L.T, Scott R.E. Differences in membrane fluidity and structure in contact-inhibited and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1974, **71**(5):1992-4.
- Beeharry N., Chambers J.A., and Green I.C. Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis*, 2004, **9**(5):599-607.
- Beiraghi S, Zhou M, Talmadge C.B, Went-Sumegi N, Davis J.R, Huang D, Saal H, Seemayer T.A, Sumegi J. Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene*, 2003, **309**(1):11-21.
- Bell R.M, Coleman R.A. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.*, 1980, **49**:459-87.
- Bene H, Lasky D, Ntambi J.M. Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2001, **284**(5):1194-8.

- Berge K, Tronstad K.J, Bohov P, Madsen L, Berge R.K. Impact of mitochondrial beta-oxidation in fatty acid-mediated inhibition of glioma cell proliferation. *J Lipid Res.*, 2003, **44**(1):118-27.
- Bhowmick N.A, Chytil A, Plieth D, Gorska A.E, Dumont N, Shappell S, Washington M.K, Neilson E.G, Moses H.L. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, 2004, **303**(5659):848-51.
- Bjornsti M.A, Houghton P.J. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004, **4**(5):335-48.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**(8):911-917.
- Boggs K.P, Rock C.O, Jackowski S. Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem.*, 1995, **270**(19):11612-8.
- Cacciotti P, Libener R, Betta P, Martini F, Porta C, Procopio A, Strizzi L, Penengo L, Tognon M, Mutti L, Gaudino G. SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001, **98**(21):12032-7.
- Cacciotti P, Strizzi L, Vianale G, Iaccheri L, Libener R, Porta C, Tognon M, Gaudino G, Mutti L. The presence of simian-virus 40 sequences in mesothelioma and mesothelial cells is associated with high levels of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2002, **26**(2):189-93.
- Camassei F.D, Cozza R, Acquaviva A, Jenkner A, Rava L, Gareri R, Donfrancesco A, Bosman C, Vadala P, Hadjistilianou T, Boldrini R. Expression of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) in retinoblastoma and its correlation with tumor aggressiveness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2003, **44**(6):2399-403.
- Cantley L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, **296**(5573):1655-7.
- Cao J, Blond J.P, Bezard J. Inhibition of fatty acid delta 6- and delta 5-desaturation by cyclopropene fatty acids in rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1210**(1):27-34.
- Carpenter L, Cordery D, Biden T.J. Inhibition of protein kinase C delta protects rat INS-1 cells against interleukin-1beta and streptozotocin-induced apoptosis. *Diabetes*, 2002, **51**(2):317-24.
- Carstens C.P, Kramer A, Fahl W.E. Adhesion-dependent control of cyclin E/cdk2 activity and cell cycle progression in normal cells but not in *Ha-ras* transformed NRK cells. *Exp Cell Res.*, 1996, **229**(1):86-92.
- Cases S, Smith S.J, Zheng Y.W, Myers H.M, Lear S.R, Sande E, Novak S, Collins C, Welch C.B, Lusis A.J, Erickson S.K, Farese R.V Jr. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998, **95**(22):13018-23.

- Cases S, Stone S.J, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal K.D, Voelker T, Farese R.V Jr. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem.*, 2001, **276**(42):38870-6.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.*, 1982, **257**(13):7847-51.
- Caviglia J.M, de Gomez Dumm I.N, Coleman R.A, Igal R.A. Phosphatidylcholine deficiency upregulates enzymes of triacylglycerol metabolism in CHO cells. *J Lipid Res.*, 2004, **45**(8):1500-1509.
- Cazzolli R, Carpenter L, Biden T.J, Schmitz-Peiffer C. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase Czeta, in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes*, 2001, **50**(10):2210-8.
- Chawla A, Repa J.J, Evans R.M, Mangelsdorf D.J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 2001, **294**(5548):1866-70.
- Chen C.S, Mrksich M, Huang S, Whitesides G. M, Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, **276**(5317):1425-1428.
- Chen I.A, Roberts R.W, Szostak J.W. The emergence of competition between model protocells. *Science*, 2004, **305**(5689):1474-6.
- Chen K, Li D, Jiang Y.H, Yao W.J, Wang X.J, Wei X.C, Gao J, Xie L.D, Yan Z.Y, Wen Z.Y, Chien S. Influence of expressed TRAIL on biophysical properties of the human leukemic cell line Jurkat. *Cell Res.*, 2004, **14**(2):161-8.
- Choi Y, Park Y, Storkson J.M, Pariza M.W, Ntambi J.M. Inhibition of stearyl-CoA desaturase activity by the cis-9,trans-11 isomer and the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2002, **294**(4):785-90.
- Chow K-C. and Ross W.E. Topoisomerase-Specific Drug Sensitivity in Relation to Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, **7**(9):3119-3123.
- Christie W.W., 1973. Lipid Analysis -isolation, separation, identification and structural analysis of lipids-, *Pergamon Press*.
- Chung M, Ha S, Jeong S, Bok J, Cho K, Baik M, Choi Y. Cloning and characterization of bovine stearyl CoA desaturase cDNA from adipose tissues. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 2000, **64**(7):1526-30.
- Clandinin M.T., Cheema S., Field C.J., Garg M.L., Venkatraman J., and Clandinin T.R. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.*, 1991, **5**:2761-2769.
- Clark A.S, West K.A, Blumberg P.M, Dennis P.A. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res.*, 2003, **63**(4):780-6.
- Clement J.M, Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase: insights into regulatory mechanisms and novel functions. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, **257**(3):643-50.

- Cnop M., Hannaert J.C., Hoorens A., Eizirik D.L., and Pipeleers D.G. Inverse Relationship Between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation. *Diabetes*, 2001, **50**:1771-1777
- Cohen P, Miyazaki M, Succi N.D, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas A.A, Sharma R, Hudgins L.C, Ntambi J.M, Friedman J.M. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*, 2002, **297**(5579):240-3.
- Coleman R.A, Lee D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res.*, 2004, **43**(2):134-76.
- Conforti G, Zanetti A, Pasquali-Ronchetti I, Quagliano D Jr, Neyroz P, Dejana E. Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J Biol Chem.*, 1990, **265**(7):4011-9.
- Cornell R. B. and Horwitz A. F. Apparent Coordination of the Biosynthesis of Lipids in Cultured Cells: Its Relationship to the Regulation of the Membrane Sterol:Phospholipid Ratio and Cell Cycling. *J. Cell Biol.*, 1980, **86**:810-819.
- Coussens L.M, Fingleton B, Matrisian L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 2002, **295**(5564):2387-92.
- Craig L, Johnson J.E, Cornell R.B. Identification of the membrane-binding domain of rat liver CTP:phosphocholine cytidyltransferase using chymotrypsin proteolysis. *J Biol Chem.*, 1994, **269**(5):3311-7.
- Cui Z, Houweling M, Chen M.H, Record M, Chap H, Vance D.E, Terce F. A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.*, 1996, **271**(25):14668-71.
- de Alaniz M.J, de Gomez Dumm I.N, Brenner R.R. Effect of different acids with delta 9,12-dienoic structures on delta 9 desaturation activity in rat liver microsomes. *Lipids*, 1986, **21**(7):425-9.
- de Vries J. E., Vork M. M., Roemen T. H. M., de Jong Y. F., Cleutjens J. P. M., van der Vusse G. J., and van Bilsen M. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Lipid Res.*, 1997, **38**:1384-1394.
- del Pozo M.A, Alderson N.B, Kiosses W.B, Chiang H.H, Anderson R.G, Schwartz M.A. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*, 2004, **303**(5659):839-42.
- Demoulin J. B, Ericsson J, Kallin A, Rorsman C, Ronnstrand L, Heldin C. H. Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.*, 2004, **279**(34):35392-35402.
- Diaz-Guerra M.J, Junco M, Bosca L. Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J Biol Chem.*, 1991, **266**(35):23568-76.
- Ding X-Z, Hennig R, Adrian T.E. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer.*, 2003,

2(1):10.

- Dobrzyn A, Dobrzyn P, Miyazaki M, Sampath H, Chu K, Ntambi J.M. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases CTP:choline cytidyltransferase translocation into the membrane and enhances phosphatidylcholine synthesis in liver. *J Biol Chem.*, 2005, **280**(24):23356-62.
- Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Cohen P, Asilmaz E, Hardie D.G, Friedman J.M, Ntambi J.M. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2004, **101**(17):6409-14.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin M.E, Dufour S, Cline G.W, Slezak L.A, Andersen D.K, Hundal R.S, Rothman D.L, Petersen K.F, Shulman G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.*, 1999, **103**(2):253-9.
- Du X, Jiang Y, Qian W, Lu X, Walsh J.P. Fatty acids inhibit growth-factor-induced diacylglycerol kinase alpha activation in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.*, 2001, **357**(Pt 1):275-82.
- Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*, 2000, **275**(40):30749-52.
- Dytar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger H.M, Spinaz G.A, Donath M.Y. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*, 2001, **50**(9):2105-13.
- Eitel K, Staiger H, Rieger J, Mischak H, Brandhorst H, Brendel M.D, Bretzel R.G, Haring H.U, Kellerer M. Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes*, 2003, **52**(4):991-7.
- Enoch H.G, Catala A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem.*, 1976, **251**(16):5095-103.
- Enser M. Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycaemic mice (ob/ob). *Biochem J.*, 1975, **148**(3):551-5.
- Estey E, Adlakha R. C, Hittelman W. N, Zwelling L. A. Cell cycle stage dependent variations in drug-induced topoisomerase II mediated DNA cleavage and cytotoxicity. *Biochemistry*, 1987, **26**(14):4338-4344.
- Ettinger S.L, Sobel R, Whitmore T.G, Akbari M, Bradley D.R, Gleave M.E, Nelson C.C. Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res.*, 2004, **64**(6):2212-21.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, **281**(5381):1317-22.
- Falvella F.S, Pascale R.M, Gariboldi M, Manenti G, De Miglio M.R, Simile M.M, Dragani

- T.A, Feo F. Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis*, 2002, **23**(11):1933-6.
- Field C.J, Ryan E.A, Thomson A.B, Clandinin M.T. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. *J Biol Chem.*, 1990, **265**(19):11143-50.
 - Finney R.E, Nudelman E, White T, Bursten S, Klein P, Leer L.L, Wang N, Waggoner D, Singer J.W, Lewis R.A. Pharmacological inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is associated with induction of phosphatidylinositol accumulation and cytolysis of neoplastic cell lines. *Cancer Res.*, 2000, **60**(18):5204-13.
 - Finstad H. S., Drevon C. A., Kulseth M. A., Synstad A. V., Knudsen E. and Kolset S. O. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.*, 1998, **336**:451-459.
 - Freshney R. Ian, 2000. Culture of Animal Cells -a manual of basic technique-, fourth edition, Ed. Wiley-Liss.
 - Fresno Vara J.A, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.*, 2004, **30**(2):193-204.
 - Friedman J.M. A war on obesity, not the obese. *Science*, 2003, **299**(5608):856-8.
 - Friesen J.A, Campbell H.A, Kent C. Enzymatic and cellular characterization of a catalytic fragment of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha. *J Biol Chem.*, 1999, **274**(19):13384-9.
 - Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001, **294**(5548):1871-5.
 - Gabrielson E.W, Pinn M.L, Testa J.R, Kuhajda F.P. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res.*, 2001, **7**(1):153-7.
 - Garbay B, Boiron-Sargueil F, Shy M, Chbihi T, Jiang H, Kamholz J, Cassagne C Regulation of oleoyl-CoA synthesis in the peripheral nervous system: demonstration of a link with myelin synthesis. *J Neurochem.*, 1998, **71**(4):1719-26.
 - Gazdar A.F, Butel J.S, Carbone M. SV40 and human tumours: myth, association or causality?. *Nat Rev Cancer.*, 2002, **2**(12):957-64.
 - Gokmen-Polar Y, Murray N.R, Velasco M.A, Gatalica Z, Fields A.P. Elevated protein kinase C beta1 is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2001, **61**(4):1375-81.
 - Golfman L.S, Bakovic M, Vance D.E. Transcription of the CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha gene is enhanced during the S phase of the cell cycle. *J Biol Chem.*, 2001, **276**(47):43688-92.
 - Gould R.J, Ginsberg B.H, Spector A.A. Lipid effects on the binding properties of a reconstituted insulin receptor. *J Biol Chem.*, 1982, **257**(1):477-84.
 - Greene E.L, Lu G, Zhang D, Egan B.M. Signaling events mediating the additive effects of

oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension*, 2001, **37**(2):308-12.

- Habib N.A, Wood C.B, Apostolov K, Barker W, Hershman M.J, Aslam M, Heinemann D, Fermor B, Williamson R.C, Jenkins W.E, Masters J.R.W, Embleton M.J. Stearic acid and carcinogenesis. *Br J Cancer*, 1987, **56**(4):455-8.
- Hanahan D, Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, **100**(1):57-70.
- Hanczyc M.M, Fujikawa S.M, Szostak J.W. Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division. *Science*, 2003, **302**(5645):618-22.
- Hannah V.C, Ou J, Luong A, Goldstein J.L, Brown M.S. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem.*, 2001, **276**(6):4365-72.
- Hannun Y.A, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.*, 2000, **10**(2):73-80.
- Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem.*, 2002, **277**(29):25847-50.
- Hao M, Mukherjee S, Sun Y, Maxfield F.R. Effects of cholesterol depletion and increased lipid unsaturation on the properties of endocytic membranes. *J Biol Chem.*, 2004, **279**(14):14171-8.
- Harbour J.W, Dean D.C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol.*, 2000, **2**(4):E65-7.
- Hardy S, St-Onge G.G, Joly E, Langelier Y, Prentki M. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem.*, 2005, **280**(14):13285-91.
- Hardy S., El-Assaad W., Przybytkowski E., Joly E., Prentki M., and Langeliers Y. Saturated Fatty Acid-induced Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. A Role for Cardiolipin. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**(34):31861-31870.
- Hardy S., Langelier Y., and Prentki M. Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects. *Cancer Res.*, 2000, **60**:6353-6358.
- Haunerland N.H, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res.*, 2004, **43**(4):328-49.
- Heinemann F.S, Korza G, Ozols J. A plasminogen-like protein selectively degrades stearoyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem.*, 2003, **278**(44):42966-75.
- Heinemann F.S, Ozols J. Degradation of stearoyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**(12):3445-53.
- Hla T, Lee M.J, Ancellin N, Paik J.H, Kluk M.J. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science*, 2001, **294**(5548):1875-8.
- Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak T.W, Nakano T. Hepatocyte-

- specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest.*, 2004, **113**(12):1774-83.
- Houchens D. P., Ovejera A. A., and Barker A. D. en "The Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research". D. P. Houchens and A. A. Ovejera Eds. 1978, pp. 267-280, G. Fischer, Struttgart.
 - Houchens D.P. and Ovejera A.A. Eds. "The Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research". 1978, G. Fischer, Struttgart.
 - Høvik K.E, Spydevold O.S, Bremer J. Thia fatty acids as substrates and inhibitors of stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1349**(3):251-6.
 - Howard B. V. and Kritchevsky D. The lipids of Normal Diploid (WI-38) and SV40-Transformed Human Cells. *Int. J. Cancer*, 1969, **4**:393-402.
 - Hsu M.H, Savas U, Griffin K.J, Johnson E.F. Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem.*, 2001, **276**(30):27950-8.
 - Igal R. A, Caviglia J. M, de Gomez Dumm I. N, Coleman R. A. Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is used for triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res.*, 2001, **42**(1):88-95.
 - Igal R.A, Coleman R.A. Acylglycerol recycling from triacylglycerol to phospholipid, not lipase activity, is defective in neutral lipid storage disease fibroblasts. *J Biol Chem.*, 1996, **271**(28):16644-51.
 - Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta.*, 2000, **1483**(3):301-315.
 - Jackowski S. Coordination of Membrane Phospholipid Synthesis with the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.*, 1994, **296**(5):3858-3867.
 - Jackowski S, Fagone P. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem.*, 2005, **280**(2):853-6.
 - Jansen A.P, Verwiebe E.G, Dreckschmidt N.E, Wheeler D.L, Oberley T.D, Verma A.K. Protein kinase C-epsilon transgenic mice: a unique model for metastatic squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 2001, **61**(3):808-12.
 - Jasani B, Cristaudo A, Emri S.A, Gazdar A.F, Gibbs A, Krynska B, Miller C, Mutti L, Radu C, Tognon M, Procopio A. Association of SV40 with human tumours. *Semin Cancer Biol.*, 2001, **11**(1):49-61.
 - Jayadev S, Liu B, Bielawska A.E, Lee J.Y, Nazaire F, Pushkareva MYu, Obeid L.M, Hannun Y.A. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem.*, 1995, **270**(5):2047-52.
 - Jayakumar A, Tai M.H, Huang W.Y, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala S.S, Wakil S.J. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995, **92**(19):8695-9.
 - Jeffcoat R, Pollard M.R. Studies on the inhibition of the desaturases by cyclopropenoid fatty acids. *Lipids*, 1977, **12**(6):480-5.

- Jones B.H, Maher M.A, Banz W.J, Zemel M.B, Whelan J, Smith P.J, Moustaid N. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol.*, 1996, **271**(1 Pt 1):E44-9.
- Kaestner K.H, Ntambi J.M, Kelly T.J Jr, Lane M.D. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem.*, 1989, **264**(25):14755-61.
- Kahn B.B, Flier J.S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.*, 2000, **106**(4):473-81.
- Kakuma T, Lee Y, Unger R.H. Effects of leptin, troglitazone, and dietary fat on stearoyl CoA desaturase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2002, **297**(5):1259-63.
- Kang J. S, Krauss R. S. Ras induces anchorage-independent growth by subverting multiple adhesion-regulated cell cycle events. *Mol Cell Biol.*, 1996, **16**(7):3370-3380.
- Kasai T., Ohguchi K., Nakashima S., Ito Y., Naganawa T., Kondo N., and Nozawa Y. Increased Activity of Oleate-Dependent Type Phospholipase D During Actinomycin D-Induced Apoptosis in Jurkat T Cells. *The journal of Immunology*, 1998, **161**: 6469-6474.
- Kasturi R, Joshi V.C. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.*, 1982, **257**(20):12224-30.
- Kawada M, Masuda T, Ishizuka M, Takeuchi T. 15-Deoxyspergualin inhibits Akt kinase activation and phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem.*, **2002**, **277**(31):27765-71.
- Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1348**(1-2):79-90.
- Khan W.A, Blobe G, Halpern A, Taylor W, Wetsel W.C, Burns D, Loomis C, Hannun Y.A. Selective regulation of protein kinase C isoenzymes by oleic acid in human platelets. *J Biol Chem.*, 1993, **268**(7):5063-8.
- Khoo D.E, Fermor B, Miller J, Wood C.B, Apostolov K, Barker W, Williamson R.C, Habib N.A. Manipulation of body fat composition with sterculic acid can inhibit mammary carcinomas in vivo. *Br J Cancer*, 1991, **63**(1):97-101.
- Kim H.J, Miyazaki M, Ntambi J.M. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J Lipid Res.*, 2002, **43**(10):1750-7.
- King M.E, Spector A.A. Effect of specific fatty acyl enrichments on membrane physical properties detected with a spin label probe. *J Biol Chem.*, 1978, **253**(18):6493-501.
- Kleinfeld A.M, Prothro D, Brown D.L, Davis R.C, Richieri G.V, DeMaria A. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol.*, 1996, **78**(12):1350-1354.
- Knudsen J, Neergaard T.B, Gaigg B, Jensen M.V, Hansen J.K. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr.*, 2000, **130**(2S Suppl):294S-298S.

- Kopelman P.G. Obesity as a medical problem. *Nature*, 2000, **404**(6778):635-43.
- Kotzka J, Muller-Wieland D, Roth G, Kremer L, Munck M, Schurmann S, Knebel B, Krone W. Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res.*, 2000, **41**(1):99-108.
- Kridel S.J, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith J.W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.*, 2004, **64**(6):2070-5.
- Kuhajda F. P, Jenner K, Wood F. D, Hennigar R. A, Jacobs L. B, Dick J. D, Pasternack G. R. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(14):6379-6383.
- Kuhajda F. P, Pizer E. S, Li J. N, Mani N. S, Frehywot G. L, and Townsend C. A. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(7):3450-3454.
- Kumar-Sinha C, Ignatoski K.W, Lippman M.E, Ethier S.P, Chinnaiyan A.M. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res.*, 2003, **63**(1):132-9.
- Kumar V.B, Vyas K, Buddhiraju M, Alshaher M, Flood J.F, Morley J.E. Changes in membrane fatty acids and delta-9 desaturase in senescence accelerated (SAMP8) mouse hippocampus with aging. *Life Sci.*, 1999, **65**(16):1657-62.
- Kurebayashi S, Hirose T, Miyashita Y, Kasayama S, Kishimoto T. Thiazolidinediones downregulate stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 1997, **46**(12):2115-8.
- Landschulz K.T, Jump D.B, MacDougald O.A, Lane M.D. Transcriptional control of the stearyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1994, **200**(2):763-8.
- Ledoux S, Runembert I, Koumanov K, Michel J.B, Trugnan G, Friedlander G. Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res.*, 2003, **92**(8):848-55.
- Lefkowitz J.B, Rogers M, Lennartz M.R, Brown E.J. Essential fatty acid deficiency impairs macrophage spreading and adherence. Role of arachidonate in cell adhesion. *J Biol Chem.*, 1991, **266**(2):1071-6.
- Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res.*, 1996, **35**(2):169-201.
- Leikin A.I, Brenner R.R. Cholesterol-induced microsomal changes modulate desaturase activities. *Biochim Biophys Acta.*, 1987, **922**(3):294-303.
- Leikin A.I, Brenner R.R. In vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. *Biochim Biophys Acta.*, 1988, **963**(2):311-9.
- Li J, Ding S.F, Habib N.A, Fermor B.F, Wood C.B, Gilmour R.S. Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int J Cancer.*, 1994, **57**(3):348-52.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S.I, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L,

- McCombie R, Bigner S.H, Giovanella B.C, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M.H, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997, **275**(5308):1943-7.
- Li J, Yu X, Pan W, Unger R.H. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2002, **282**(6):E1334-41.
 - Li Y, Lazar M.A. Differential gene regulation by PPARgamma agonist and constitutively active PPARgamma2. *Mol Endocrinol.*, 2002, **16**(5):1040-8.
 - Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, 1976, **17**(1):62-70.
 - Lindberg L.E, Hedjazifar S, Baeckstrom D. c-erbB2-induced disruption of matrix adhesion and morphogenesis reveals a novel role for protein kinase B as a negative regulator of alpha(2)beta(1) integrin function. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(8):2894-908.
 - Lippiello P.M, Holloway C.T, Garfield S.A, Holloway P.W. The effects of estradiol on stearyl-CoA desaturase activity and microsomal membrane properties in rooster liver. *J Biol Chem.*, 1979, **254**(6):2004-9.
 - Listenberger L. L., Han X., Lewis S. E., Cases S., Farese R. V. Jr, Ory D. S., and Schaffer, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2003, **100**(6): 3077-3082
 - Listenberger L. L., Ory D. S., and Schaffer J. E. Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**(18):14890-14895.
 - Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**:265-275
 - Lu G, Greene E.L, Nagai T, Egan B.M. Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1998, **32**(6):1003-10. (b)
 - Lu G, Meier K.E, Jaffa A.A, Rosenzweig S.A, Egan B.M. Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1998, **31**(4):978-85. (a)
 - Lu G, Morinelli T.A, Meier K.E, Rosenzweig S.A, Egan B.M. Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ Res.*, 1996, **79**(3):611-8.
 - Lu J, Pei H, Kaeck M, Thompson H.J. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog.*, 1997, **20**(2):204-15.
 - Luberto C and Hannun Y. A. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(23):14550-14559.
 - Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic

- islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*, 2002, **51**(5):1437-42.
- Lusis A.J. Atherosclerosis. *Nature*, 2000, **407**(6801):233-41.
 - Maedler K., Spinas G. A., Dytar D., Moritz W., Kaiser N., and Donath M. Y. Distinct Effects of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on β -Cell Turnover and Function. *Diabetes*, 2001, **50**:69-76.
 - Mandil R, Ashkenazi E, Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Rosenthal G, Umansky F, Lorenzo P.S, Blumberg P.M, Brodie C. Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. *Cancer Res.*, 2001, **61**(11):4612-9.
 - Manning D.D, Reed N.D, Shaffer C.F. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin of congenitally athymic (nude) mice. *J Exp Med.*, 1973, **138**(2):488-94.
 - Maser R.S, DePinho R.A. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*, 2002, **297**(5581):565-9.
 - Mason R.J, Pan T, Edeen K.E, Nielsen L.D, Zhang F, Longphre M, Eckart M.R, Neben S. Keratinocyte growth factor and the transcription factors C/EBP alpha, C/EBP delta, and SREBP-1c regulate fatty acid synthesis in alveolar type II cells. *J Clin Invest.*, 2003, **112**(2):244-55.
 - Mathias S, Pena L.A, Kolesnick R.N. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J.*, 1998, **335** (Pt 3):465-80.
 - Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty A.H, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S, Yamada N. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res.*, 2002, **43**(6):911-20.
 - McDonnell A.C, Van Kirk E.A, Isaak D.D, Murdoch W.J. Inhibitory effects of progesterone on plasma membrane fluidity and tumorigenic potential of ovarian epithelial cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood).*, 2003, **228**(3):308-14.
 - Merrill A.H Jr, Nixon D.W, Williams R.D. Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. *J Lipid Res.*, 1985, **26**(5):617-22.
 - Merrill A.H Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem.*, 2002, **277**(29):25843-6.
 - Meyer T, Hart I.R. Mechanisms of tumour metastasis. *Eur J Cancer.*, 1998, **34**(2):214-21.
 - Miller C.W, Ntambi J.M. Peroxisome proliferators induce mouse liver stearyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996, **93**(18):9443-8.
 - Miquel K, Pradines A, Terce F, Selmi S, Favre G. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Biol Chem.*, 1998,

273(40):26179-86.

- Mishra R., Simonson M. S. Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol.*, 2005, **4**(1):2
- Miyazaki M, Jacobson M.J, Man W.C, Cohen P, Asilmaz E, Friedman J.M, Ntambi J.M. Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem.*, 2003, **278**(36):33904-11.
- Miyazaki M, Ntambi J.M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, **68**(2):113-21.
- Miyazaki M., Kim Y-C., Gray-Keller M. P., Attie A. D. and Ntambi J. M. The Biosynthesis of Hepatic Cholesterol Esters and Triglycerides is Impaired in Mice with a Disruption of the Gene for Stearoyl-CoA Desaturase 1. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(39):30123-30138.
- Miyazaki M., Kim Y-C, and Ntambi J. M. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.*, 2001, **42**:1018-1024. (b)
- Miyazaki M., Man W. C., and Ntambi J. M. Targeted Disruption of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene in Mice Causes Atrophy of Sebaceous and Meibomian Glands and Depletion of Wax Esters in the Eyelid. *J. Nutr.*, 2001, **131**:2260-2268. (a)
- Montanaro M.A, Rimoldi O.J, Igal R.A, Montenegro S, Tarres M.C, Martinez S.M, Brenner R.R. Hepatic delta9, delta6, and delta5 desaturations in non-insulin-dependent diabetes mellitus eSS rats. *Lipids*, 2003, **38**(8):827-32.
- Murakami K, Chan S.Y, Routtenberg A. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. *J Biol Chem.*, 1986, **261**(33):15424-9.
- Mziaut H, Korza G, Ozols J. The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000, **97**(16):8883-8.
- Nadler S.T, Stoehr J.P, Schueler K.L, Tanimoto G, Yandell B.S, Attie A.D. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000, **97**(21):11371-6.
- Nakamura M.T, Nara T.Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, **68**(2):145-50.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 1995, **9**(7):484-96.
- Ntambi J.M, Buhrow S.A, Kaestner K.H, Christy R.J, Sibley E, Kelly T.J Jr, Lane M.D. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem.*, 1988, **263**(33):17291-300.

- Ntambi J.M, Miyazaki M, Stoehr J.P, Lan H, Kendziorski C.M, Yandell B.S, Song Y, Cohen P, Friedman J.M, Attie A.D. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002, **99**(17):11482-6.
- Ntambi J.M. Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *J Biol Chem.*, 1992, **267**(15):10925-30.
- Ogretmen B., Schady D., Usta J., Wood R., Kravaka J. M., Luberto C., Birbes H., Hannun Y. A. and Obeid L. M. Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276** (27):24901-24910.
- Ozols J. Degradation of hepatic stearyl CoA delta 9-desaturase. *Mol Biol Cell*, 1997, **8**(11):2281-90.
- Page K, Lange Y. Cell adhesion to fibronectin regulates membrane lipid biosynthesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.*, 1997, **272**(31):19339-42.
- Paumen M.B, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, 1997, **272**(6):3324-9.
- Pelech S.L, Vance D.E. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **779**(2):217-51.
- Pizer E.S, Thupari J, Han W.F, Pinn M.L, Chrest F.J, Frehywot G.L, Townsend C.A, Kuhajda F.P. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.*, 2000, **60**(2):213-8.
- Prasad M.R, Joshi V.C. Regulation of rat hepatic stearoyl coenzyme A desaturase. The roles of insulin and carbohydrate. *J Biol Chem.*, 1979, **254**(4):997-9.
- Preiss J., Loomis C. R., Bishop W. R., Stein R., Niedel J. E., and Bell R. M. Quantitative Measurement of *sn*-1,2-Diacylglycerols Present in Platelets, Hepatocytes, and *ras*- and *sis*-Transformed Normal Rat Kidney Cells. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**(19):8597-8600.
- Qiu R. G, Abo A, McCormick F, Symons M. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol.*, 1997, **17**(6):3449-3458.
- Rahman S.M, Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee S.H, Miyazaki M, Ntambi J.M. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003, **100**(19):11110-5.
- Rao G.A, Lew G, Larkin E.C. Alcohol ingestion and levels of hepatic fatty acid synthetase and stearoyl-CoA desaturase activities in rats. *Lipids*, 1984, **19**(2):151-3.
- Reddig P.J, Dreckschmidt N.E, Ahrens H, Simsiman R, Tseng C.P, Zou J, Oberley T.D, Verma A.K. Transgenic mice overexpressing protein kinase Cdelta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, 1999, **59**(22):5710-8.
- Richieri G.V, Kleinfeld A.M. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res.*,

1995, **36**(2):229-240.

- Rosenthal M.D. Fatty acid metabolism of isolated mammalian cells. *Prog Lipid Res.*, 1987, **26**(2):87-124.
- Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, Bublely G, Balk S, Loda M. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.*, 2003, **1**(10):707-15.
- Roth G, Kotzka J, Kremer L, Lehr S, Lohaus C, Meyer H.E, Krone W, Muller-Wieland D. MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J Biol Chem.*, 2000, **275**(43):33302-7.
- Ruggieri S, Roblin R, Black P.H. Lipids of whole cells and plasma membrane fractions from Balb/c3T3, SV3T3, and concanavalin A-selected revertant cells. *J Lipid Res.*, 1979, **20**(6):760-71.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. Molecular Cloning -a laboratory manual-, second edition, 1989, *Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Samuel W, Kutty R.K, Nagineni S, Gordon J.S, Prouty S.M, Chandraratna R.A, Wiggert B. Regulation of stearoyl coenzyme A desaturase expression in human retinal pigment epithelial cells by retinoic acid. *J Biol Chem.*, 2001, **276**(31):28744-50.
- Samuel W, Nagineni C.N, Kutty R.K, Parks W.T, Gordon J.S, Prouty S.M, Hooks J.J, Wiggert B. Transforming growth factor-beta regulates stearoyl coenzyme A desaturase expression through a Smad signaling pathway. *J Biol Chem.*, 2002, **277**(1):59-66.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell S.M, Riggins G.J, Willson J.K, Markowitz S, Kinzler K.W, Vogelstein B, Velculescu V.E. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 2004, **304**(5670):554.
- Scaglia N., Caviglia J. M., and Igal R. A. High Stearoyl-CoA Desaturase protein and activity levels in simian virus 40 transformed-human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1687**:141-151.
- Schaffer J.E. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 2002, **282**(2):E239-46.
- Schaffer J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.*, 2003, **14**(3):281-7.
- Scherman D., Bessodes M., Cameron B., Herscovici J., Hofland H., Pitard B., Soubrier F., Wils P. and Crouzet J. Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, **9**:480-485.
- Schulze A, Zerfass-Thome K, Berges J, Middendorp S, Jansen-Durr P, Henglein B. Anchorage-dependent transcription of the cyclin A gene. *Mol Cell Biol.*, 1996, **16**(9):4632-4638.
- Sessler A.M, Kaur N, Palta J.P, Ntambi J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.*, 1996, **271**(47):29854-8.

- Shanklin J, Whittle E, Fox B.G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 1994, **33**(43):12787-94.
- Sherr C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 2000, **60**(14):3689-95.
- Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(49):32487-32490. (b)
- Shimabukuro M, Zhou Y.T, Levi M, Unger R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1998, **95**(5):2498-502. (c)
- Shimabukuro M., Zhou Y-T., Lee Y. and Unger R. H. Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**(6):3547-3550. (a)
- Shimomura I, Shimano H, Korn B.S, Bashmakov Y, Horton J.D. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.*, 1998, **273**(52):35299-306.
- Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y. Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1991, **88**(12):5149-53.
- Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.*, 2000, **106**(2):171-6.
- Shureiqi I, Lippman S.M. Lipoyxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2001, **61**(17):6307-12.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science*, 2000, **290**(5497):1721-6. (b)
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2000;**1**(1):31-9. (a)
- Singh J.K, Dasgupta A, Adayev T, Shahmehdi S.A, Hammond D, Banerjee P. Apoptosis is associated with an increase in saturated fatty acid containing phospholipids in the neuronal cell line, HN2-5. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1304**(3):171-8.
- Singh R.K, Hardy R.W, Wang M.H, Williford J, Gladson C.L, McDonald J.M, Siegal G.P. Stearate inhibits human tumor cell invasion. *Invasion Metastasis*, 1995, **15**(3-4):144-55.
- Sinha S, Perdomo G, Brown N.F, O'Doherty R.M. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem.*, 2004, **279**(40):41294-301.
- Sinicrope F.A, Dudeja P.K, Bissonnette B.M, Safa A.R, Brasitus T.A. Modulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by alterations in lipid fluidity of rat liver canalicular membrane vesicles. *J Biol Chem.*, 1992, **267**(35):24995-5002.
- Siperstein M.D. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res.*, 1984, **25**(13):1462-8.

- Smart E.J, Graf G.A, McNiven M.A, Sessa W.C, Engelman J.A, Scherer P.E, Okamoto T, Lisanti M.P. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1999;**19**(11):7289-304.
- Sok M, Sentjurc M, Schara M, Stare J, Rott T. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. *Ann Thorac Surg.*, 2002, **73**(5):1567-71.
- Sok M, Sentjurc M, Schara M. Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Lett.*, 1999, **139**(2):215-20.
- Spector A. A., and Yorek M. A. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.*, 1985, **26**:1015-1035.
- Spragg R.G, Li J. Effect of phosphocholine cytidyltransferase overexpression on phosphatidylcholine synthesis in alveolar type II cells and related cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2000, **22**(1):116-24.
- Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem.*, 1999, **266**(1):17-25.
- Strittmatter P, Spatz L, Corcoran D, Rogers M.J, Setlow B, Redline R. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1974, **71**(11):4565-9.
- Stukey J.E, McDonough V.M, Martin C.E. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem.*, 1990, **265**(33):20144-9.
- Sugimoto K, Yamada K, Egashira M, Yazaki Y, Hirai H, Kikuchi A, Oshimi K. Temporal and spatial distribution of DNA topoisomerase II alters during proliferation, differentiation, and apoptosis in HL-60 cells. *Blood*, 1998, **91**(4):1407-1417.
- Sullivan C.S, Pipas J.M. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2002, **66**(2):179-202.
- Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang C.P, Silver D.L, Cheng C, Maxfield F.R, Tall A.R. Stearyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem.*, 2003, **278**(8):5813-20.
- Sundberg J.P, Boggess D, Sundberg B.A, Eilertsen K, Parimoo S, Filippi M, Stenn K. Asebia-2J (Scd1(ab2J)): a new allele and a model for scarring alopecia. *Am J Pathol.*, 2000, **156**(6):2067-75.
- Sundler R, Akesson B, Nilsson A. Effect of different fatty acids on glycerolipid synthesis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.*, 1974, **249**(16):5102-7.
- Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.*, 2003, **9**(6):2204-12.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada K.M. Inhibition of cell

- migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 1998, **280**(5369):1614-7.
- Terce F, Brun H, Vance D.E. Requirement of phosphatidylcholine for normal progression through the cell cycle in C3H/10T1/2 fibroblasts. *J Lipid Res.*, 1994, **35**(12):2130-42.
 - Thai S.F, Allen J.W, DeAngelo A.B, George M.H, Fuscoe J.C. Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(8):1317-22.
 - Thiede M.A, Ozols J, Strittmatter P. Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem.*, 1986, **261**(28):13230-5.
 - Thornberry N.A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, **281**(5381):1312-6.
 - Tijburg L.B, Geelen M.J, van Golde L.M. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1004**(1):1-19.
 - Tiku P.E, Gracey A.Y, Macartney A.I, Beynon R.J, Cossins A.R. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science*, 1996, **271**(5250):815-8.
 - Ulloa J. E., Casiano C. A., and De Leon M. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.*, 2003, **84**:655-668.
 - Unger R. H. and Zhou Y-T. Lipotoxicity of β -Cells in Obesity and in Other Causes of Fatty Acid Spillover. *Diabetes*, 2001, **50**(Suppl. 1):S118-S121.
 - Unger R.H, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585**(2-3):202-12. (a)
 - Unger R.H. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.*, 2002, **53**:319-36. (b)
 - Upla P, Marjomaki V, Kankaanpaa P, Ivaska J, Hyypia T, Van Der Goot FG, Heino J. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol Biol Cell.*, 2004, **15**(2):625-36.
 - Urade R, Kito M. Perturbation of lipid metabolism by palmitic acid in Chinese hamster V79-R cells. *J Biochem (Tokyo)*, 1982, **91**(5):1639-49.
 - Vacaresse N, Lajoie-Mazenc I, Auge N, Suc I, Frisach M.F, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ Res.*, 1999, **85**(10):892-9.
 - Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen J.V. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2002, **62**(3):642-6.
 - Vance J.E. Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: the same but not the same. *Trends Biochem Sci.*, 1998, **23**(11):423-8.
 - Varner J.A, Cheresch D.A. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol.*, 1996, **8**(5):724-30.
 - Venable M. E., Lee J. Y., Smyth M. J., Bielawska A. and Obeid L. M. Role of Ceramide in

Cellular Senescence. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**(51):30701-30708.

- Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann T.A, Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003, **100**(14):8053-8.
- Wang H.Q, Altomare D.A, Skele K.L, Poulikakos P.I, Kuhajda F.P, Di Cristofano A, Testa J.R. Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene*, 2005, **24**(22):3574-82.
- Wang J, Yu L, Schmidt R.E, Su C, Huang X, Gould K, Cao G. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005, **332**(3):735-42.
- Wang Y, MacDonald J.I, Kent C. Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase in HeLa cells. Effect of oleate on phosphorylation and intracellular localization. *J Biol Chem.*, 1993, **268**(8):5512-8.
- Weiner F.R, Smith P.J, Wertheimer S, Rubin C.S. Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearyl-CoA desaturase-1. *J Biol Chem.*, 1991, **266**(35):23525-8.
- Weinhold P.A, Charles L, Rounsifer M.E, Feldman D.A. Control of phosphatidylcholine synthesis in Hep G2 cells. Effect of fatty acids on the activity and immunoreactive content of choline phosphate cytidyltransferase. *J Biol Chem.*, 1991, **266**(10):6093-100.
- Weinhold P.A, Rounsifer M.E, Williams S.E, Brubaker P.G, Feldman D.A. CTP:phosphorylcholine cytidyltransferase in rat lung. The effect of free fatty acids on the translocation of activity between microsomes and cytosol. *J Biol Chem.*, 1984, **259**(16):10315-21.
- Welsh J.B, Sapinoso L.M, Su A.I, Kern S.G, Wang-Rodriguez J, Moskaluk C.A, Frierson H.F Jr, Hampton G.M. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.*, 2001, **61**(16):5974-8.
- Whitcomb R.W, Linehan W.M, Knazek R.A. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest.*, 1988, **81**(1):185-8.
- Yahyaoui M.H, Sanchez A, Folch J.M. Partial nucleotide sequence of the goat stearyl coenzyme A desaturase cDNA and gene structure. *J Anim Sci.*, 2002, **80**(3):866-7.
- Yang J. J, Kang J. S, Krauss R. S. Ras signals to the cell cycle machinery via multiple pathways to induce anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol.*, 1998, **18**(5):2586-2595.
- Yang Y-A, Han W.F, Morin P.J, Chrest F.J, Pizer E.S. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Cell Res.*, 2002, **279**(1):80-90.
- Yen C.L, Mar M.H, Zeisel S.H. Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase. *FASEB J.*, 1999,

13(1):135-42.

- Yoshiji H, Kuriyama S, Ways D.K, Yoshii J, Miyamoto Y, Kawata M, Ikenaka Y, Tsujinoue H, Nakatani T, Shibuya M, Fukui H. Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res.*, 1999, **59**(17):4413-8.
- Yuan H, Veldman T, Rundell K, Schlegel R. Simian virus 40 small tumor antigen activates AKT and telomerase and induces anchorage-independent growth of human epithelial cells. *J Virol.*, 2002, **76**(21):10685-91.
- Zhang F, Pan T, Nielsen L.D, Mason R.J. Lipogenesis in fetal rat lung: importance of C/EBPalpha, SREBP-1c, and stearoyl-CoA desaturase. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2004, **30**(2):174-83.
- Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty S.M. Human stearoyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J.*, 1999, **340** (Pt 1):255-64.
- Zhang L, Ge L, Tran T, Stenn K, Prouty S.M. Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element. *Biochem J.*, 2001, **357**(Pt 1):183-93.
- Zhang S, Yang Y, Shi Y. Characterization of human SCD2, an oligomeric desaturase with improved stability and enzyme activity by cross-linking in intact cells. *Biochem J.*, 2005, **388**(Pt 1):135-42.
- Zheng Y, Eilertsen K.J, Ge L, Zhang L, Sundberg J.P, Prouty S.M, Stenn K.S, Parimoo S. Scd1 is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet.*, 1999, **23**(3):268-70.
- Zheng Y, Prouty S.M, Harmon A, Sundberg J.P, Stenn K.S, Parimoo S. Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics.*, 2001, **71**(2):182-91.
- Zhou W., Simpson J., McFadden J. M., Townsend C. A., Medghalchi S. M., Vadlamudi A., Pinn M. L., Ronnett G. V., and Kuhajda F. P. Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells. *Cancer Res.*, 2003, **63**:7330-7337.
- Zhou Y-T., Grayburn P., Karim A., Shimabukuro M., Higa M., Baetens D., Orci L. and Unger R. H. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**(4):1784-1789.
- Zhu X, Ohtsubo M, Bohmer R. M, Roberts J. M, and Assoian R. K. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol.*, 1996, **133**(2):391-403.

Fe de erratas

La Tabla 3 (distribución de ácidos grasos de la línea celular A549 hSCDas- α y controles debe reemplazarse por la tabla que se adjunta abajo. Estas correcciones no alteran los resultados ni las conclusiones del trabajo.

	Control	hSCDas- α	
14:0	2.24 \pm 0.20	3.82 \pm 0.94	p=0.017
16:0	24.33 \pm 0.57	29.17 \pm 2.33	p=0.007
16:1 n-7	14.53 \pm 0.40	11.23 \pm 0.70	p<0.001
18:0	12.02 \pm 0.38	13.28 \pm 1.10	ns
18:1 n-9	32.61 \pm 0.76	27.15 \pm 1.86	p=0.002
18:1 n-7	7.78 \pm 0.81	7.99 \pm 0.15	ns
18:2 n-6	2.62 \pm 0.08	2.53 \pm 0.48	ns
20:4 n-6	3.86 \pm 0.23	4.82 \pm 0.45	p=0.009
16:1 n-7/16:0	0.60 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	p<0,001
16:1 n-7+ 18:1 n-7/16:0	0.92 \pm 0.04	0.66 \pm 0.03	p<0.001
18:1 n-9/18:0	2.71 \pm 0.06	2.05 \pm 0.03	p<0.001
MUFA/SFA	1.42 \pm 0.02	1.00 \pm 0.07	p<0.001

Tabla 3: Distribución porcentual de los ácidos grasos de los lípidos totales en las células A549 hSCDas- α y controles. Los lípidos celulares se extrajeron por el método de Blight & Dyer y los ésteres metílicos derivados de sus ácidos grasos constituyentes se analizaron por GLC. Los valores representan la media \pm SD N=4. *t*-test