



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y
ANTIPROLIFERATIVO DEL ACEITE ESTERCÚLICO
in vitro”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

ERIC FRANCISCO CONTRERAS LÓPEZ

Asesores:

ROSA MARÍA OLIART ROS

MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

ABRIL RAMÍREZ HIGUERA

H. VERACRUZ, VER.

Noviembre de 2019



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Veracruz, Veracruz, **11 noviembre 2019**

Div. Estudios de Posgrado e Investigación

OFICIO: ITV/DEPI/No.457/2019

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. ERIC FRANCISCO CONTRERAS LÓPEZ
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico *in vitro*"

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

EL H. JURADO


BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.


DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
PRESIDENTE




DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES
SECRETARIO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA
VOCAL


DRA. ABRIL RAMÍREZ HIGUERA
SUPLENTE

c. p. Expediente del Estudiante
Archivo

BOM*





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

El presente trabajo de tesis titulado: "**Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico *in vitro***" presentado por el (la) C. **Eric Francisco Contreras López** ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTORA


DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS

CO-DIRECTORA


DRA. ABRIL RAMÍREZ HIGUERA

REVISOR


DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES

REVISOR


DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA

BOM*



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500
www.veracruz.itecnm.mx



DEDICATORIAS

A DIOS

Por el regalo de la vida y la familia, por el don inmerecido de su inagotable amor.

A MIS PADRES

Siempre van en mi corazón, su recuerdo y ejemplo son importantes pilares en mi vida.

A VICKY

Por ser mi ayuda idónea en el camino de la vida, llenando con amor cada instante y dándome inspiración para seguir siempre firme y adelante.

A MI HIJO ABRAHAM Y MI HIJA LIZ

Por llenar mi vida de razones para triunfar y ser un motor que impulsa mis ganas de aprender, por hacerme ver que la vida tiene sentido si estamos siempre juntos y por su amor, apoyo y valentía para lograr esta meta, sobre todo, por enseñarme a creer en los milagros.

DRA. OLIART, DRA. ABRIL, DR. MAURICIO, DR. VALERIO, CARLOS, SERGIO, JENY, JEFFREY, ADÁN, OSCAR, FANNNY, VERO, HIRAM Y MONTSE

Este trabajo no habría sido posible sin su apoyo, su valioso tiempo, sabios consejos, gran paciencia, amistad sincera y el regalo de su experiencia. No hay palabras para describir lo agradecido que estoy con cada uno de ustedes y quedo en deuda con la vida por haberlos puesto en mi camino durante esta maravillosa etapa de aprendizaje y crecimiento personal y profesional.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), a la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana (UV), al Laboratorio de Bioprocesos, Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición y a Laboratorio de Bioquímica, pertenecientes a la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto de maestría.

A la Dra. Rosa María Oliart Ros y todo el laboratorio a su cargo por su amistad, apoyo y recursos destinados a la realización de este trabajo.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes y sus estudiantes Carlos, Sergio, Marian y Alberto, así como su colaboradora Jeny, por su apoyo y aportación material e intelectual para la realización de un gran número de ensayos de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Valerio Alfaro y sus estudiantes Adán y Oscar por su apoyo y orientación constante en los ensayos realizados en su laboratorio.

A la Dra. Abril Ramírez Higuera y al Dr. Zorba Josué Hernández Estrada por su confianza y amistad que siempre hicieron ver más fácil el camino de la investigación.

A la Dra. Madeleine Hidalgo Morales y la Dra. Patricia G. Mendoza García por su valioso tiempo invertido en la revisión del proyecto y sus atinadas observaciones que permitieron mejorar la calidad del trabajo realizado.

A todos ustedes, ¡infinitas gracias!

RESUMEN

Contreras López, Eric Francisco. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre 2019. Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico. Asesores: Dra. Rosa María Oliart Ros, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dra. Abril Ramírez Higuera.

El cáncer se deriva de un crecimiento descontrolado de células debido a mutaciones acumuladas (OMS, 2017). La actividad de la enzima Estearoil CoA Desaturasa (SCD) se ha sugerido como blanco terapéutico en cáncer. El aceite de las semillas de las plantas del género *Sterculia* es rico en ácido estercúlico, un ácido graso ciclopropenoide con capacidad de inhibir a la SCD. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico (AE) *in vitro*, determinar su concentración inhibitoria media (IC₅₀) en células cancerosas y sanas, evaluar el efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad, ciclo celular, apoptosis, expresión, niveles de enzima y actividad de la SCD. Se utilizó aceite de semillas de *Sterculia apetala* de la zona de Los Tuxtlas, Veracruz, en el que, por medio de cromatografía de gases-espectrometría de masas, se encontró un 34% de ácido estercúlico. Se determinó la viabilidad en líneas celulares cancerosas de próstata, hígado, pulmón, mama, colon, cervicouterino, y osteosarcoma. Las líneas más afectadas por el AE fueron las de cáncer metastásico de próstata PC-3 (49% viabilidad), las de cáncer de mama MCF-7 (60%) y las de cáncer de próstata dependiente de andrógenos LnCaP (68%), con una IC₅₀ de 3.6 mM para PC-3, mientras que en células sanas de próstata RWPE1 la viabilidad fue de 89%. Por citometría de flujo se encontró que el AE detiene el ciclo celular en G2 y lleva a las células cancerosas a apoptosis, sin afectar a las sanas. Mediante Q-PCR y Western-Blot se encontró que el AE no modifica significativamente la expresión del gen y síntesis de la SCD. Los índices de desaturación C16:1/C16:0 y C18:1/C18:0 mostraron una disminución de la actividad de SCD entre el 48 y 86% con respecto al testigo para PC-3, entre el 43 y 69% para LnCaP y entre un 28 y 50% para RWPE1. En conclusión, el aceite estercúlico tiene potencial en el tratamiento del cáncer de próstata debido a que su efecto apoptótico y antiproliferativo es comparable con el de fármacos y métodos de inhibición de SCD.

ABSTRACT

Contreras López, Eric Francisco. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre 2019. Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico. Asesores: Dra. Rosa María Oliart Ros, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, Dra. Abril Ramírez Higuera.

Cancer derives from uncontrolled cell growth due to accumulated mutations (WHO, 2017). The activity of the enzyme steryl CoA Desaturase (SCD) has been suggested as a therapeutic target in cancer. The oil from the seeds of the plants of the genus *sterculia* is rich in esteric acid, a cyclopropenoid fatty acid with the ability to inhibit SCD. The objectives of this work were to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effect of ester oil (EA) in vitro, determine its mean inhibitory concentration (IC₅₀) in cancer and healthy cells, evaluate the effect of ester oil in the viability, cell cycle, apoptosis, expression, enzyme levels and SCD activity. *sterculia apetala* seed oil from the area of Los Tuxtlas, Veracruz, was used in which, by means of gas chromatography-mass spectrometry, it was found that it possesses 34% of esterculic acid. Cell viability was determined in cancer cell lines of prostate, liver, lung, breast, colon, cervical, and osteosarcoma. The lines most affected by As were those of PC-3 metastatic prostate cancer (49% viability), those of MCF-7 breast cancer (60%) and those of LnCaP androgen-dependent prostate cancer (68%), with an IC₅₀ of 3.6 mM for PC-3, while in healthy RWPE1 prostate cells the viability was 89%. Flow cytometry found that AE stops the cell cycle in G₂ and leads cancer cells to apoptosis, without affecting healthy ones. Through Q-PCR and Western-Blot it was found that AE does not significantly modify gene expression and SCD synthesis. Desaturation indices C16: 1 / C16: 0 and C18: 1 / C18: 0 showed a decrease in SCD activity between 48 and 86% compared to the control for PC-3, between 43 and 69% for LnCaP and between 28 and 50% for RWPE1. In conclusion, steroculic oil has potential in the treatment of prostate cancer because its apoptotic and antiproliferative effect is comparable with that of drugs and methods of SCD inhibition.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Fuente natural del aceite estercúlico.....	4
2.2 Características y composición del aceite estercúlico.....	6
2.3 Efectos del aceite estercúlico como inhibidor de Estearoil CoA Desaturasa.....	7
2.4 Características de la Estearoil Co-A Desaturasa.....	8
2.5 Función de la Estearoil CoA Desaturasa en el metabolismo de lípidos.....	9
2.6 Función de la Estearoil CoA Desaturasa en el ciclo celular.....	10
2.8 Cáncer, situación mundial y nacional.....	10
2.9 Importancia de la regulación del ciclo celular en el cáncer.....	11
2.10 Importancia del metabolismo de lípidos en el cáncer.....	13
2.11 Implicaciones de la Estearoil CoA Desaturasa en el cáncer.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.1.1 Objetivos particulares.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Materiales.....	18
4.1.1 Semillas de <i>Steculia apétala</i>	18
4.1.2 Líneas celulares cancerosas y sanas.....	19
4.2 Metodología.....	21

4.2.1 Extracción del aceite estercúlico y preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos.....	21
4.2.2 Caracterización del aceite estercúlico por cromatografía de gases y espectrometría de masas	21
4.2.3 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad de líneas celulares cancerosas	22
4.2.4 Ensayos de viabilidad en células PC-3, LnCaP, RWPE1 y obtención de la concentración inhibitoria media en células PC-3.....	23
4.2.5 Efecto del aceite estercúlico en el ciclo celular de PC-3, LnCaP y RWPE1 por citometría de flujo.....	24
4.2.6 Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células PC-3, LnCaP y RWPE1 por citometría de flujo.....	25
4.2.7 Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de Estearoil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1 por ensayos de Q-PCR.....	25
4.2.8 Efecto del aceite estercúlico sobre los niveles de Estearoil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1 mediante ensayos de Western Blot	26
4.2.9 Efecto del aceite estercúlico sobre el Índice de desaturación como indicador de la actividad de Estearoil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1 Composición del aceite estercúlico, aceite de soya y aceite de maíz.	28
5.2 Resultados de los ensayos de viabilidad en células cancerosas y sanas tratadas con aceite estercúlico	29
5.2.1 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en la línea celular PC-3.....	31
5.2.2 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en la línea celular LnCaP.....	34
5.2.3 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en las líneas celulares sanas de próstata PrsC y RWPE1.	36
5.3 Análisis de ciclo celular por citometría de flujo	41
5.3.1 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea PC-3.....	41
5.3.2 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea LnCaP	45
5.3.3 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea RWPE1	49
5.4 Análisis de apoptosis por citometría de flujo	53
5.4.1 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular PC-3.....	53

5.4.2 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular LnCaP	57
5.4.3 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular RWPE1	61
5.5 Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión del gen de Estearoil CoA Desaturasa en las células PC-3, LnCaP y RWPE1	64
5.6 Efecto del aceite estercúlico sobre los niveles de enzima Estearoil CoA Desaturasa en PC-3, LnCaP y RWPE1.	66
5.7 Efecto del aceite estercúlico sobre la actividad de Estearoil CoA Desaturasa en PC-3, LnCaP y RWPE1.	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
APÉNDICE A	80
APÉNDICE B	81
APÉNDICE C	82
APÉNDICE D	83
APÉNDICE E	85
APÉNDICE F	88
APÉNDICE G	89
APÉNDICE H	90

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1: Composición del aceite obtenido de <i>Sterculia apetala</i> .	6
TABLA 4.1: Características de las líneas celulares utilizadas para el estudio de viabilidad celular.	20
TABLA 5.1: Composición de ácidos grasos del aceite estercúlico, de soya y de maíz.	28
TABLA 5.2: Índices de desaturación en células PC3, LnCaP y RWPE1 después del tratamiento con aceite estercúlico (AE), aceite de soya (AS) y aceite de maíz (AM).	68
TABLA 5.3: Reporte de inhibición de actividad de SCD con distintos métodos.	70
TABLA G1. Soluciones molares de aceite estercúlico	89
TABLA H1. Cálculos de viabilidad celular	90
TABLA H2. Cálculos de la IC ₅₀	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Árbol de <i>Sterculia apetala</i> .	5
FIGURA 4.1 Semillas de <i>Sterculia apetala</i>	18
FIGURA 5.1 Efecto del ácido estercúlico 4mM sobre distintas líneas celulares de cáncer tratadas durante 48 h.	30
FIGURA 5.2 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células PC-3 a 48 h de tratamiento	31
FIGURA 5.3 Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) del aceite estercúlico en células PC-3.	32
FIGURA 5.4 Efecto de ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en PC-3 a 48 h de tratamiento	33
FIGURA 5.5 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células LnCaP a 48 h de tratamiento.	34
FIGURA 5.6 Efecto del ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en LnCaP a 48 h de tratamiento.	35
FIGURA 5.7 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células RWPE1 a 48 h de tratamiento.	36
FIGURA 5.8 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células PrSC a las 48 h de tratamiento.	37
FIGURA 5.9 Efecto del ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en RWPE1.	38
FIGURA 5.10 Efecto del aceite estercúlico, de soya y de maíz a 4 mM sobre la viabilidad celular en PrSC a 48 h de tratamiento.	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 5.11 Efecto del aceite estercúlico 4mM en células PC-3, RWPE1, PrSC y LnCaP a 48 h de tratamiento.	40
Figura 5.12: Cambios en la morfología de las células PC-3 a las 48 h de tratamiento.	42
Figura 5.13: Perfiles de distribución de las fases del ciclo celular en PC-3 a las 48 h de tratamiento.	43
FIGURA 5.14: Porcentaje de células PC-3 en fase G1 y G2 a las 48 h de tratamiento.	44
Figura 5.15: Cambios en la morfología de las células LnCaP a las 48 h de tratamiento.	46
Figura 5.16: Perfiles de distribución en las fases del ciclo celular en LnCaP a las 48 h de tratamiento.	47
FIGURA 5.17: Porcentaje de células LnCaP en fase G1 (A) y G2 (B) a las 48 h de tratamiento.	48
Figura 5.18: Cambios en la morfología de las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento.	49
Figura 5.19: Perfiles de distribución del ciclo celular en RWPE1 a las 48 h de tratamiento.	51
FIGURA 5.20: Porcentaje de células RWPE1 en las fases G1 (A) y G2 (B) a las 48 h de tratamiento.	52
FIGURA 5.21: Cambios en la morfología de las células PC-3 a las 48 h de tratamiento.	54
Figura 5.22: Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células PC-3 a las 48 h de tratamiento.	55
FIGURA 5.23: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células PC-3 con distintos tratamientos a 48 de tratamiento.	56
Figura 5.24: Cambios en la morfología de las células LnCaP a las 48 h de tratamiento.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.25: Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células LnCaP a las 48 h de tratamiento.	59
FIGURA 5.26: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células LnCaP a las 48 h de tratamiento.	60
Figura 5.27: Cambios en la morfología de las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento.	61
Figura 5.28 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento.	62
FIGURA 5.29: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células RWPE-1 con distintos tratamientos durante 48 h.	63
FIGURA 5.30: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células PC-3 a 48 h de tratamiento.	64
FIGURA 5.31: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células LnCaP a 48 h de tratamiento.	65
FIGURA 5.32: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células RWPE1 a 48 h de tratamiento.	65
FIGURA 5.33: Cuantificación de enzima SCD en relación a GAPDH en células PC3 (A), LnCaP (B) y RWPE1 (C).	67

LISTA ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA Carboxilasa
AGC	Ácidos grasos ciclopropenoides
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CG-EM	Cromatografía de gases-Espectometría de masas
FASN	Complejo ácido graso sintasa
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
LD ₅₀	Dosis letal media
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
SCD	Estearoil CoA Desaturasa
siRNA	ARN pequeño de interferencia
CVT11127	N-(2-(6-(3,4-Dichlorobenzylamino)-2-(4-methoxyphenyl)-3-oxopyrido[2,3-b]pyrazin-4(3H)-yl)ethyl) acetamide
AGS	Ácidos grasos saturados
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
DMEM	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium
PrEBM	Prostate Epithelial Cell Growth Basal Medium.
SCBM	Stromal Cell Basal Medium
PSA	Antígeno prostático específico
RA	Receptor de andrógenos
p53	Proteína supresora de tumores
pRb	Proteína del retinoblastoma
EPA	Ácido eicosapentaenoico
AA	Ácido araquidónico

LISTA DE ABREVIATURAS

DHA	Ácido docosahexaenoico
QBS	2-amino-N-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNAi	RNA interference

1. INTRODUCCIÓN

El papel de los lípidos en la fisiología celular es amplio. En la membrana celular, además de su función estructural, el microambiente lipídico tiene gran influencia en la actividad de las proteínas de la membrana y sus respectivas consecuencias en la señalización celular (Smart *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 2000). Varios tipos de lípidos, como los lisofosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos o sus derivados, por mencionar algunos, intervienen en procesos celulares tan diversos como la regulación del metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la senescencia y muerte celular, la angiogénesis y la vasoconstricción, entre otros (Duplus *et al.*, 2000).

Los lípidos tienen un rol importante como almacén de energía. Si la célula requiere energía puede hidrolizar triglicéridos y sus ácidos grasos constituyentes se distribuyen hacia distintos tejidos para ser degradados. De acuerdo a la hipótesis del “gen ahorrativo”, la capacidad de almacenar energía en forma de grasa pudo ser una ventaja adaptativa para organismos que no tenían una constante disponibilidad de alimentos (Friedman, 2003).

Otra importante función de los lípidos es la de mensajeros químicos. Las hormonas esteroideas, por ejemplo, sirven como mensajeras entre diferentes tejidos. Algunos lípidos, como las feromonas, participan en la comunicación química entre organismos; otros lípidos funcionan como mensajeros intracelulares o como factores de transcripción regulando la expresión génica (Weinhold *et al.*, 1991).

Algunas enfermedades como la aterosclerosis, diabetes, obesidad, y cáncer, se han relacionado con el metabolismo de lípidos (Berliner *et al.*, 1995). Lo anterior indica que una regulación eficiente del metabolismo lipídico es necesaria para mantener la homeostasis celular.

Se ha reportado que las células cancerosas tienen una conversión alterada de ácidos grasos saturados a monoinsaturados en comparación con células sanas. Como ejemplo se puede mencionar que la proporción de ácido esteárico a oleico es menor en el carcinoma hepatocelular que en un hígado sano (Gleeson *et al.*, 1990). Experimentos como el de Gleeson indican que el crecimiento de células tumorales podría modularse mediante la regulación de la conversión de ácidos grasos saturados a monoinsaturados, es decir, regulando a la enzima Esteroil Co-A Desaturasa (SCD). Dicha enzima cataliza la reacción en la que un doble enlace es colocado entre los carbonos 9 y 10 del ácido palmítico y del ácido esteárico para formar el ácido palmitoleico y oleico, respectivamente (Urrutia, 2010).

La SCD es un punto de control clave en la lipogénesis debido a que cataliza una etapa limitante en la ruta de síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y su efecto ha sido implicado en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular a través de los efectos sobre la fluidez de la membrana celular y la transducción de señales. En células de carcinoma de pulmón humano A549, la disminución de la actividad de la SCD sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por ácidos grasos saturados, en comparación con células testigo, incrementa el periodo de latencia y disminuye el crecimiento de tumores en ratones *nude* (Scaglia, 2005). Resultados como estos dejan ver que al regular globalmente el metabolismo lipídico, la SCD modula la proliferación y supervivencia celular, lo que hace énfasis en la importante participación de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados para mantener el fenotipo celular neoplásico.

El ácido estercúlico se encuentra en proporciones elevadas en el aceite obtenido de semillas de plantas del género *Sterculia* (Herrera-Meza *et al.*, 2014); este ácido graso ciclopropenoide de 19 carbonos puede reducir la actividad de la SCD de forma

reversible hasta el 20% de su actividad normal, y tener efecto sobre la fluidez de la membrana celular, así como una disminución de la proliferación celular (Diniz *et al.*, 2008). El ácido estercúlico se ha estudiado en relación al síndrome metabólico y los resultados indican una modificación del perfil lipídico en el que, en presencia de dicho ácido, incrementa la acumulación de ácido palmítico y esteárico, así como una disminución de la cantidad de ácido palmitoleico y oleico (Herrera-Meza *et al.*, 2014).

El control del metabolismo de los lípidos mediada por la regulación de SCD, cobra un especial valor debido a que cada vez hay más evidencia de que las células cancerosas muestran alteraciones en su perfil lipídico afectando la disponibilidad de lípidos estructurales para la síntesis de membranas, la síntesis y degradación de lípidos que contribuyen a la homeostasis energética y la abundancia de lípidos con funciones de señalización. Los cambios en el metabolismo de los lípidos pueden afectar numerosos procesos celulares, incluidos el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la motilidad (Santos *et al.*, 2012).

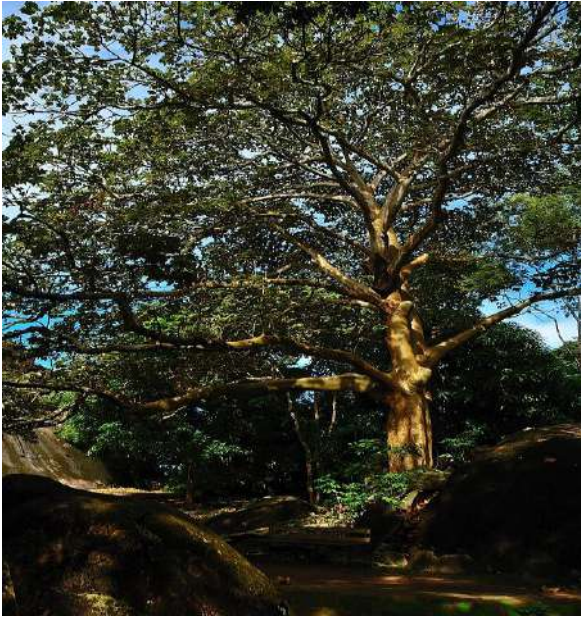
Por otra parte, algunas investigaciones señalan un efecto tóxico del ácido estercúlico sobre células sanas por las mismas razones que se exponen en párrafos anteriores, lo cual lleva a la necesidad de evaluar la viabilidad de células sanas a diferentes concentraciones del ácido estercúlico para obtener una concentración inhibitoria media (IC₅₀) que se pueda evaluar en células cancerosas y medir su efecto en la viabilidad celular, ciclo celular y apoptosis. Este estudio se acompaña de la medición del efecto de ácido estercúlico sobre la expresión del gen de SCD y la valoración de la actividad enzimática.

2. ANTECEDENTES

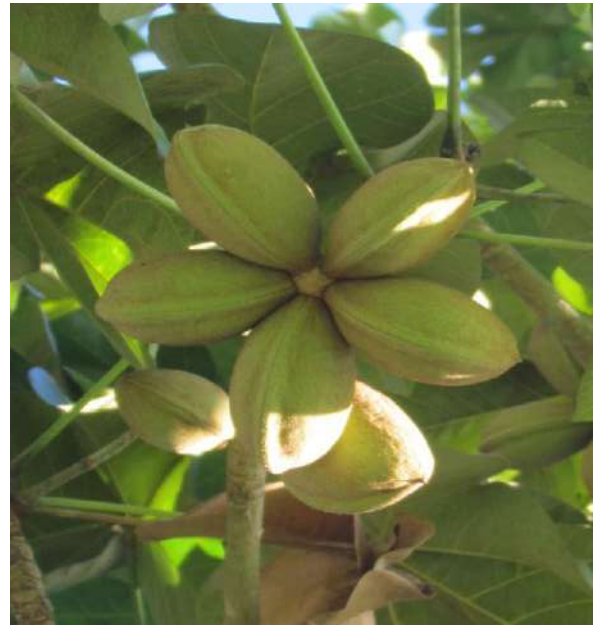
2.1 Fuente natural del aceite estercúlico

Existen aproximadamente 300 especies de árboles que componen la familia de las Malváceas y se encuentran preferentemente en las regiones tropicales en todo el mundo. En algunos países de África, donde se puede encontrar *Sterculia foétida*, sus hojas y raíces son usadas como medicina alternativa por su efecto diurético, antiinflamatorio y depresor del sistema nervioso central (Chopra *et al.*, 1992). La especie *Sterculia apétala*, conocida como “Tepetaca” en las regiones del sureste mexicano, en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas, es el árbol utilizado para la obtención del aceite en el presente proyecto.

El árbol de *Sterculia apétala* mide entre 30 y 40 m de altura con ramas distribuidas sobre el tronco. Las hojas son palmadas y lobuladas, de 15 a 50 cm de largo agrupadas al final de las ramas. Las flores son amarillas con rayas rojas o moradas y sus frutos son folículos de 8 a 10 cm de largo, agrupados de 3 a 5 conteniendo cada uno 10 a 15 semillas negras (Herrera-Meza *et al.*, 2014). El aceite contiene ácidos grasos ciclopropenoicos (AGC) en mayor porcentaje que el resto de los ácidos grasos que lo componen. En la Figura 2.1 se muestran el árbol y las semillas de *Sterculia apétala*.



a



b



c



d

FIGURA 2.1: Árbol de *Sterculia apetala*. El árbol puede alcanzar 40 m de altura (a), los frutos son folículos en grupos de 3 a 5 que miden hasta 10 cm (b), cada folículo puede tener entre 10 y 15 semillas (c y d).

2.2 Características y composición del aceite estercúlico

El aceite estercúlico es inodoro y de color amarillo claro, tiene un índice de refracción de 1.46, su gravedad específica es de 0.9, índice de yodo de 45.7, índice de acidez de 79.4 e índice de saponificación de 140.4. La composición aproximada de ácidos grasos se muestra en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1: Composición del aceite obtenido de *Sterculia apetala*.

Ácido graso	%
16:0	22.9
18:0	2.8
18:1	5.0
18:1 ciclo ^a	6.3
18:2	5.0
19:1 ciclo ^a	55.8
Otros	2.8

^aPresencia del anillo ciclopropeno. C18:1, ácido malválico; C19:1, ácido estercúlico. Los valores son expresados como porcentaje del total de ácidos grasos (Herrera-Meza et al., 2014).

El ácido estercúlico (ácido 9,10-metilen-octadec-9-enoico) es el ácido graso encontrado en mayor proporción en el aceite obtenido de *Sterculia apetala*, tiene una gran tensión provocada por el doble enlace y anillo ciclopropénico entre los carbonos 9 y 10, razón por la cual es altamente reactivo y su punto de fusión es muy similar al de los ácidos grasos monoinsaturados, su peso molecular es de 294.462 g/mol, a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido y el anillo ciclopropénico se puede romper a temperaturas mayores a 50°C y por una exposición prolongada a la luz solar (Corl et al., 2001).

2.3 Efectos del aceite estercúlico como inhibidor de Esteroil CoA Desaturasa

El ácido estercúlico, además de su papel como almacenamiento de energía y carbono en las semillas, es potencialmente un protector contra hongos e insectos (Schmid & Patterson, 1988). Hay evidencia científica que demuestra que la administración de este ácido en hamsters provoca reducciones en el peso corporal y adiposidad, mejoras en la tolerancia a la glucosa y disminución de la inflamación hepática (Major *et al.*, 2008), también se ha reportado una disminución de la resistencia a la insulina y reducción de esteatosis hepática inducidas por fructosa en ratas Wistar al suministrar aceite estercúlico como fuente de lípidos en la dieta (Ramírez-Higuera *et al.*, 2019). Se sabe que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, en combinación con la inhibición de SCD utilizando aceite estercúlico como fuente de lípidos en la dieta en ratas Wistar con síndrome metabólico inducido por sacarosa, ayudó a disminuir los niveles circulantes de triglicéridos y en la disminución de la hipertrofia de adipocitos (Morales, 2018). Por otro lado, algunos resultados advierten efectos adversos sobre la proliferación del músculo liso, función y crecimiento reproductivos, inducción de hipercolesterolemia, daño hepático y efectos carcinogénicos cuando se administran en dosis altas a ratas (> 1%) (Mujumdar *et al.*, 2000). También hay reportes de que, al suministrar 200 ppm de ésteres metílicos de ácido estercúlico en la dieta de la trucha arcoíris, se observaron cambios en la morfología del hígado, disminución de la tasa de crecimiento y alteración de los perfiles lipídicos (Rohem *et al.*, 1970). Estos efectos se han relacionado con la capacidad del ácido estercúlico para inhibir la actividad Esteroil-CoA Desaturasa (SCD), una enzima central lipogénica (Gómez *et al.*, 2003).

2.4 Características de la Esteroil Co-A Desaturasa

La esteroil-CoA desaturasa (SCD) es una enzima encargada de catalizar la incorporación del primer doble enlace, en posición 9-cis, en varios ácidos grasos saturados para formar sus derivados monoinsaturados; dicha reacción requiere de oxígeno, NADPH y una cadena de transporte de electrones microsomal, compuesta por la enzima citocromo b5-reductasa y el citocromo b5 (Strittmatter *et al.*, 1974). Los sustratos principales son los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) en su forma activada, es decir, unidos a la Coenzima A (CoA). Los productos de la SCD son principalmente ácido palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9) (Enoch *et al.*, 1976).

Hay cuatro isoformas de la SCD en ratones (SCD, SCD2, SCD3 y SCD4) y son codificadas por genes distintos. 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 SCD y SCD2 de ratón y rata. La secuencia de aminoácidos en distintos organismos hace pensar que la SCD posee 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 (Stokes *et al.*, 1990).

Se puede encontrar a la SCD humana en tejido adiposo, hígado, cerebro, corazón y pulmón. Esta enzima es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional por numerosos factores dietarios, hormonales y de desarrollo, así como por distintas drogas en diversos organismos. La SCD tiene una corta vida media debido a la actividad de proteasas microsomales que la degradan, esto permite que la regulación ajuste rápidamente la cantidad de SCD en relación a las necesidades de la célula. Llama la atención que la SCD tenga un alto grado de regulación mientras se sabe que el producto de su actividad es el ácido oleico, uno de los más abundantes en la dieta (Zhang *et al.*, 2013).

2.5 Función de la Esteroil CoA Desaturasa en el metabolismo de lípidos

La esteroil-CoA desaturasa (SCD), como ya se ha mencionado anteriormente, es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados. Está demostrado que es un punto de control crítico que regula la lipogénesis hepática y la oxidación de los lípidos. La deficiencia de SCD activa las vías metabólicas que promueven la oxidación de lípidos y la disminución de la lipogénesis hepática y en músculo esquelético. Un posible mecanismo es mediante la activación de la proteína quinasa por AMPc. La SCD, al regular la producción de ácidos grasos monoinsaturados (AGM), regula también la síntesis de fosfolípidos, triglicéridos, ésteres de colesterol, ceras y alquildiacilgliceroles. Los AGM también actúan como mediadores de la transducción de señales y la diferenciación celular, influyen en la apoptosis y pueden llegar a tener una importante participación en la mutagénesis (Dobrzyn *et al.*, 2010).

Varias manifestaciones del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 se asocian con alteraciones en la composición de lípidos intracelulares, lo que coloca a la SCD como un objetivo terapéutico potencial para su tratamiento. Se ha demostrado que los ratones deficientes en SCD tienen un mayor gasto de energía, una adiposidad corporal reducida, una mayor sensibilidad a la insulina y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y a la esteatosis hepática (Dobrzyn *et al.*, 2010). La desaturación altera las propiedades físicas de los ácidos grasos de cadena larga, incluidos los utilizados para la síntesis de fosfoglicéridos de membrana y es determinante en la fluidez de la misma.

Por otra parte, se sabe que la SCD controla la síntesis de ácidos grasos modulando la actividad de la acetil Co-A carboxilasa (ACC), lo que representa un mecanismo por el que SCD tiene efecto sobre la fluidez de la membrana celular. Al acumularse el ácido palmítico y esteárico libre en las células cancerosas, se puede inactivar la ACC por acumulación de producto, por lo que SCD, al ayudar a mantener la relación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, es un modulador de la actividad de ACC en células cancerosas (Igal, 2016).

2.6 Función de la Esteroil CoA Desaturasa en el ciclo celular

Las células, antes de dividirse, deben duplicar sus membranas. 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). La reducción de la síntesis de fosfatidilcolina también disminuye la viabilidad de células tumorales. La adición de fosfatidilcolina exógena, o precursores de su síntesis, así como la sobreexpresión de la enzima CTP:fosfolina citidililtransferasa, previene parcial o totalmente la apoptosis inducida por inhibidores de la síntesis de este fosfolípido. El tratamiento de células normales con factores de crecimiento induce un aumento en la expresión de distintas enzimas lipogénicas como ácido graso sintetasa y la SCD, y también aumentan las enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos de membrana. La relación entre los ácidos grasos insaturados y saturados sintetizados *de novo* se incrementa 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 (Demoulin *et al.*, 2004). De forma paralela, el ácido oleico y otros ácidos grasos insaturados estimulan la actividad de la CTP:fosfolina citidililtransferasa y como resultado, aumenta la síntesis de fosfatidilcolina, en mayor medida que los ácidos grasos saturados (Scaglia, 2005).

2.8 Cáncer, situación mundial y nacional

El cáncer es un crecimiento descontrolado de células en el organismo que pueden llegar a constituir una masa tumoral. Los tumores benignos son aquellos donde existe un crecimiento de células sin la capacidad de migrar a otros sitios; por el contrario, los tumores malignos están formados por células anormales que se diseminan e invaden otros tejidos a través del flujo sanguíneo y del sistema linfático, proceso conocido como metástasis. Los tumores malignos son denominados cáncer, este término agrupa a más de 100 enfermedades que se identifican de acuerdo al sitio de origen del tumor (WHO, 2018).

El cáncer se desarrolla gracias a alteraciones de los genes responsables del control del ciclo celular, dichas alteraciones son el resultado de interacciones entre factores genéticos y agentes externos, ya sean de carácter ambiental, químico o biológico como algunos virus, bacterias y parásitos (WHO, 2018).

El cáncer ocupa un papel principal entre las causas de mortalidad en el mundo. En el año 2012, se registraron 14 millones de nuevos casos y se prevé que el número de casos aumente en un 70% en los siguientes 20 años. En el año 2018, el cáncer ocasionó 9.6 millones de defunciones y se registraron 18.1 millones de nuevos casos. Para las mujeres, los cinco principales tipos de cáncer en 2018, fueron el de mama (24.2%), colorectal (9.4%), de pulmón (8.4%), cervicouterino (6.6%) y de tiroides (5.1%). Para los hombres, los cinco principales tipos de cáncer en el mismo año, fueron el de pulmón (14.5%), de próstata (13.5%), colorectal (10.9%), de estómago (7.2%) y de hígado (6.3%) (WHO, 2018).

En México, en 2017, el cáncer tuvo un impacto económico de 1.5 millones de pesos anuales por cada paciente y se registraron 80,000 decesos por cáncer, siendo la tercera causa de muerte, después de enfermedades cardiovasculares y diabetes. Los cinco tipos de cáncer de mayor incidencia fueron el de pulmón (8,600 muertes), próstata (6,000 muertes), mama (5,000 muertes), cervicouterino (4,000 muertes) y estómago (3,000 muertes), de acuerdo a los datos publicados por la secretaría de salud en 2018.

2.9 Importancia de la regulación del ciclo celular en el cáncer

Una adecuada regulación del ciclo celular permite la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. Existen puntos de control que actúan en la transcripción de los genes de las ciclinas y de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), en las modificaciones postranscripcionales de estas proteínas, o en la degradación de las mismas. La regulación por retroalimentación positiva y negativa

actúan en la progresión del ciclo celular. Los controles negativos en la progresión están presentes durante el desarrollo, diferenciación, senescencia y muerte celular, y pueden tener una función importante en la prevención de la tumorigénesis (Hengst *et al.*, 1994).

Hay dos etapas donde operan los puntos de control en el ciclo celular: el primero ocurre durante la transición de la fase G1 a la fase S; el segundo se lleva a cabo en la transición entre las etapas G2 y M. En la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la fidelidad de la replicación del genoma ha sido comprometida. Si no se interrumpe el ciclo celular cuando hay alteraciones en la replicación, la célula recién formada puede evolucionar a una célula cancerosa. Las células pueden detener la progresión del ciclo celular en una fase específica, cuando el daño es inducido por agentes extrínsecos que inhiben la replicación del ADN. Los genes que codifican para proteínas que participan en esta detención y que establecen la dependencia del ciclo celular son los que constituyen los puntos de control del ciclo, regulando los procesos de replicación, activación transcripcional, progresión del ciclo celular y apoptosis (Murray, 1992).

Es importante tomar en cuenta algunas propiedades de los puntos de control del ciclo celular:

- Los puntos de control son sistemas en cascada de transducción de señales y cada etapa puede ser un blanco terapéutico para los tratamientos antiproliferativos.
- La mayoría de los genes que codifican para enzimas que participan en los puntos de control son esenciales en células normales y ayudan a asegurar la fidelidad e integridad de la replicación del ADN.
- La reparación del ADN durante la replicación necesita el correcto funcionamiento de los puntos de control y este proceso contribuye a la fidelidad en el proceso.

- La restauración de los puntos de control que están alterados pueden retardar la evolución de la célula sana a cancerosa. Del mismo modo actúan las fuentes exógenas que intervienen en el mantenimiento del ADN.
- Si se dañan algunos puntos de control, el ciclo celular puede continuar aun cuando varias alteraciones no se hayan reparado, y si la célula se adapta a este modo de reproducción, puede aumentar la habilidad de las células para adaptarse y acelerar la evolución a cáncer.
- Al activar los puntos de control se inducen varias respuestas; por ejemplo, la expresión anormal de *p53* en células que entran a la fase S con el ADN dañado es más nociva, por el hecho de que estas células no sufren muerte por apoptosis. La función de los puntos de control en la apoptosis depende del tipo celular y de la naturaleza de las señales de proliferación.

2.10 Importancia del metabolismo de lípidos en el cáncer

Los lípidos son un grupo amplio y diverso de moléculas con una característica común: son insolubles en agua. Aquí se incluyen triacilglicéridos, fosfoglicéridos, esteroides y esfingolípidos. Tienen importantes implicaciones a nivel celular y del organismo. Los ácidos grasos son los principales componentes para la síntesis de triacilglicéridos, que se utilizan para el almacenar energía. Los fosfoglicéridos, junto con los esteroides y esfingolípidos, son componentes estructurales de las membranas biológicas (Falvella *et al.*, 2002).

Los lípidos también son importantes en la señalización, donde pueden actuar como segundos mensajeros y como hormonas. Últimas investigaciones aportan evidencia de que en las células cancerosas se modifican la disponibilidad de lípidos estructurales para la síntesis de membranas, la síntesis y degradación de lípidos que contribuyen a la homeostasis energética y la abundancia de lípidos con funciones de

señalización. Lo anterior afecta numerosos procesos celulares, incluidos el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación y la motilidad (Minville *et al.*, 2010).

Se ha reportado que en algunos tipos de cáncer, como los de mama y próstata, hay una mayor expresión del complejo ácido graso sintasa (FASN), lo que indica que la síntesis de ácidos grasos desempeña un papel importante en la patogénesis del cáncer (Menéndez *et al.*, 2007). Se sabe también que la inhibición química de la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC) contribuye a detener el crecimiento y a promover la apoptosis en células de cáncer de próstata (Fritz *et al.*, 2010). La elongasa de ácido graso de cadena larga se encuentra sobre expresada en el cáncer de próstata y es necesaria para su proliferación, posiblemente debido a su papel en la síntesis de esteroides, como los andrógenos (Fernández *et al.*, 2010). El colesterol es un componente importante de las membranas biológicas ya que modula la fluidez de la bicapa lipídica y también forma micro dominios resistentes a los detergentes llamados balsas lipídicas que coordinan la activación de algunas vías de señalización de la transmisión (Lingwood *et al.*, 2010).

2.11 Implicaciones de la Esteroil CoA Desaturasa en el cáncer

El cáncer se ha asociado con SCD por su implicación en el metabolismo de lípidos celulares. 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 *et al.*, 2002). También se puede ver un incremento en la expresión de distintas isoformas de SCD en modelos de carcinogénesis mamaria y hepática inducida químicamente en roedores (Thai *et al.*, 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 (Khoo *et al.*, 1991). Algunas ratas y ratones que presentan predisposición a

la hepatocarcinogénesis tienen una mayor expresión del gen de la SCD que cepas menos susceptibles a esta patología (Falvella *et al.*, 2002). La cantidad de ácidos grasos monoinsaturados, así como el nivel y la actividad de la SCD también se ven aumentados en células murinas y humanas transformadas (Scaglia, 2005).

La conexión entre SCD y el cáncer, aunque no es tan sencilla, se hace evidente debido a que su actividad se ve incrementada en células neoplásicas (Minville *et al.*, 2010), lo que contribuye a la desregulación del crecimiento celular debido a un desequilibrio de ácidos grasos saturados/monoinsaturados (Scaglia, 2005). La SCD controla la progresión del ciclo celular y la apoptosis y, en consecuencia, la tasa global de proliferación en células cancerosas a través de la regulación de la síntesis de lípidos (Hess *et al.*, 2010). La evidencia acumulada indica que SCD controla la tasa de replicación en las células cancerosas mediante la modulación de eventos específicos durante la progresión del ciclo celular. Los estudios realizados en células de cáncer de pulmón revelan que las células cancerosas fueron arrestadas en la fase G1 cuando se bloqueó la actividad de SCD con el inhibidor químico CVT 11127 (Hess *et al.*, 2010). Una observación similar se informó en el cáncer de mama y vejiga que fueron sometidas a inhibición de SCD con un siRNA (Mauvoisin *et al.*, 2013). La alteración del ciclo celular, y la progresión del ciclo en células sin SCD se revirtió mediante la adición de MUFA de 16 o 18 carbonos, lo que indica que la disponibilidad de MUFA es un requisito previo para las células cancerosas en las primeras fases del ciclo celular (Hess *et al.*, 2010). El grado de coordinación de SCD con las otras enzimas de la ruta de síntesis de ácidos grasos durante la replicación celular es apoyado por los hallazgos de que un arresto similar en el límite G1/S del ciclo celular se observó en células con acetil coenzima A Carboxilasa (ACC) y el complejo ácido graso sintasa (FASN) bloqueados con el fármaco Soraphen A (Beckers *et al.*, 2007). La activación concertada de la síntesis y posterior desaturación de ácidos grasos saturados (AGS) ocurre durante la fase de síntesis del ciclo celular, un momento en la vida de la célula cuando la maquinaria biosintética de fosfolípidos exige abundantes AGS y sustratos de MUFA para la biogénesis de membrana antes de la replicación celular (Igal, 2016). Con respecto a los

mecanismos moleculares por los cuales la actividad SCD está involucrada en la regulación del ciclo celular, Hess y colaboradores determinaron que la actividad de los reguladores moleculares relevantes del ciclo celular depende de la síntesis de MUFA. Posteriormente, Igal y colaboradores encontraron que los controles SCD en la progresión del ciclo celular, al menos en parte, se ejercen mediante la regulación de los niveles de ciclina D1 y CDK6, dos proteínas cuya expresión e interacción determinan el paso de las células a través de la transición G1 / S (Malumbres *et al.*, 2009; Igal *et al.*, 2016). También se sabe que los niveles de β -catenina nuclear, que activa la expresión de ciclina D1, disminuye en células cancerosas con supresión del gen SCD mediante silenciamiento génico (Mauvoisin *et al.*, 2013), sin embargo, los complejos mecanismos que relacionan los componentes moleculares de la síntesis de MUFA y la activación y la progresión del ciclo celular no han sido totalmente dilucidados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico y antiproliferativo del aceite estercúlico *in vitro*.

3.1.1 Objetivos particulares

- Determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) del aceite estercúlico en líneas celulares cancerosas y sanas.
- Evaluar el efecto del aceite estercúlico sobre la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis en líneas celulares cancerosas y sanas.
- Evaluar el efecto del aceite estercúlico sobre la expresión y actividad de Esteroil CoA Desaturasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Semillas de *Sterculia apétala*

Las semillas de *Sterculia apétala* fueron recolectadas en San Andrés Tuxtla, los meses de marzo y abril del año 2018, y se almacenaron a 4 °C hasta la extracción del aceite. El proceso comenzó con la fase de limpieza, en la que se retiró la pulpa y la pared del hueso para separar la almendra que porta el aceite de interés. La Figura 4.1 muestra las capas que se retiraron hasta llegar a la almendra donde se encuentra el aceite.



FIGURA 4.1 Semillas de *Sterculia apétala*

4.1.2 Líneas celulares cancerosas y sanas

Las líneas celulares fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (IMEGEN), adquiridas previamente en la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron células de cáncer de próstata (PC3 y LnCaP), cáncer de mama (MCF7 y BT20), cáncer de colon (CACO2 y HCT116), cáncer cervicouterino (HELA), cáncer de pulmón (A549 y H460), cáncer de hígado (HepG2) y cáncer en los huesos (U2Os). Además se cultivaron dos líneas celulares sanas: estroma de próstata (PrSC) y epitelio de próstata (RWPE1). Las características de las líneas celulares se muestran en la Tabla 4.1.

Para el mantenimiento y proliferación de las líneas celulares de cáncer de próstata se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-glutamina al 1% y piruvato al 0.1%. Para las líneas de cáncer de hígado, cervicouterino, pulmón, mama, huesos y colon, se utilizó medio DMEM suplementado con SFB al 10%. Para las células RWPE1 se utilizó un medio PrEBM con 10% de SFB y para las células PrSC se trabajó con medio SCBM con 10% de SFB.

Las células se propagaron en cajas Petri y frascos de cultivo celular (T-75, área de cultivo de 75 cm²), bajo una atmósfera del 5% de CO₂, 95% de O₂ a 37°C en incubadora. Las células se subcultivaron cada vez que alcanzaban una confluencia del 70 al 80%. Al subcultivar, se añadió 1 ml de tripsina al 1% por cada placa y se incubó durante 2 min a 37°C, se colectaron las células y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml, se centrifugó a 1000 g durante 2 min en una centrifuga LMC 4200R de BioSan. Se retiró el residuo de medio con tripsina, se contabilizó el número de células con azul de tripán y en cámara de Neubauer, y se sembraron 30,000 células por placa en 7 ml del medio correspondiente al 10% de SFB.

MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 4.1: Características de las líneas celulares utilizadas para el estudio de viabilidad celular.

Línea	Características	Medio
PC-3	Es un adenocarcinoma de próstata grado IV tomado de células epiteliales adherentes de una metástasis en hueso, es independiente de andrógenos, no expresa PSA ni RA y crece en 25 h aproximadamente.	RPMI 1640 al 10% de SFB, 1% de Glutamina y 0.1% de Piruvato.
MCF-7	son células epiteliales adherentes de adenocarcinoma de mama que expresan al receptor de estrógenos y tienen un tiempo de crecimiento aproximado de 35 h.	DMEM al 10% de SFB.
BT-20	Son células tumorigénicas epiteliales de glándula mamaria que expresan los oncogenes WNT3 y WNT7B, su crecimiento se inhibe por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), no dependen del receptor de estrógenos. su tiempo de crecimiento es entre 48 y 72 h.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
CACO2	son células epiteliales adherentes de adenocarcinoma colorrectal que expresan enterotoxinas estables al calor y factor de crecimiento epidérmico (EGF), su tiempo de crecimiento es entre 48 y 72 h.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
LnCap	Células de cáncer de próstata que modela una etapa inicial de la patología en la que aún hay respuesta a andrógenos.	RPMI 1640 al 10% de SFB.
HELA	Son células epiteliales adherentes de cáncer cervicouterino que expresan p53 y pRb, tienen un tiempo de crecimiento entre 48 y 72 h.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
H460	Son células epiteliales adherentes de cáncer de pulmón obtenidas de un derrame pleural de una persona de sexo masculino, su crecimiento es lento, entre 42 y 60 h.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
HepG2	Son células epiteliales adherentes de hepatocarcinoma de un varón y no presenta evidencia de virus de hepatitis B en el genoma de dichas células. su crecimiento ocurre entre 48 y 72 h.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
U2Os	Son células epiteliales adherentes de osteosarcoma altamente alterada cromosómicamente, su tiempo de crecimiento es de 72 h aproximadamente.	DMEM suplementado con un 10% de SFB.
RWPE1	Las células epiteliales derivadas de la zona periférica de una próstata humana adulta histológicamente normal se transfectaron con una copia única del virus del papiloma humano 18 (HPV-18) para establecer la línea celular RWPE-1	PrEBM suplementado con un 10% de SFB.
PrSC	Las células estromales de próstata se derivan de un próstata humana adulta sana.	SCBM suplementado con un 10% de SFB.

PSA: antígeno prostático específico, RA: Receptor de andrógenos, p53: proteína supresora de tumores, pRb: Proteína del retinoblastoma.

4.2 Metodología

4.2.1 Extracción del aceite estercúlico y preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos

Para la extracción del aceite se trituró la almendra en un mortero hasta conseguir una harina que se puso en contacto con n-Hexano al 95% grado HPLC marca Vela-Quim en proporción 1:3 m/v, con agitación a 100 rpm a temperatura ambiente (sin exceder 45°C) durante 24 h. Se separó la fase sólida por decantación y filtración, la mezcla de aceite y hexano contenida en la fase líquida se rota evaporó a 35°C. El aceite se almacenó a 4°C evitando la exposición a la luz (Diniz *et al.*, 2008).

Primero se colocaron 0.1 g de la muestra de aceite y se le añadieron 2 mL de n-Hexano al 95% grado HPLC marca Vela-Quim para luego someterse a agitación 30 seg. Se añadió 0.2 mL de una solución que contenía 20 mL de metanol absoluto (99.8%) de Probiotek y 2.4 g de KOH de Merck Millipore (99% de pureza), se sometió la mezcla a agitación vigorosa por 30 s, se dejó reposar hasta que la disolución de la parte superior estuviera completamente nítida. Se separó la capa superior que contenía los ésteres metílicos de ácidos grasos. La disolución se inyectó al cromatógrafo (cuyas características se mencionan en la Tabla 4.2) antes de 12 h después de este procedimiento, durante este tiempo se mantuvo en refrigeración a 4 °C (Nitao *et al.*, 2008).

4.2.2 Caracterización del aceite estercúlico por cromatografía de gases y espectrometría de masas

Tomando en cuenta que se analizaron ésteres metílicos de ácidos grasos, se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas marca Agilent modelo 7890B con un detector TCD y espectrómetro de masas 5977A, inyector splitless, columna Tracsil TR-WAX (Teknokroma de 30 m x 0.25 mm x 0.25

μm), la fase estacionaria fue polietilenglicol, el gas portador fue nitrógeno, la presión de la columna de 16 psi, la temperatura del inyector de 260°C y del detector de 280°C , la temperatura inicial fue de 150°C y se incrementó $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante 10 min, el volumen de la muestra fue de $1\ \mu\text{L}$. Las muestras se inyectaron por triplicado.

4.2.3 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad de líneas celulares cancerosas

Se evaluó la viabilidad de distintas líneas celulares en presencia de diferentes concentraciones de aceite estercúlico con el objeto de elegir las líneas más sensibles. Se realizaron pruebas preliminares de viabilidad en modelos celulares que representaban los tipos de cáncer de mayor incidencia en México: cáncer de próstata (PC-3 y LnCaP), cáncer de mama (MCF-7 y BT-20), cáncer cervical (HeLa), cáncer de colon (CaCo2), cáncer de hígado (HepG2), cáncer de pulmón (H460) y osteosarcoma (U2Os) (SSA, 2018). Se sembraron 30, 000 células por cada pozo en placas de 24 pozos, cuya viabilidad fue verificada después de la adición de azul de tripán, en una cámara de Neubauer (como se describe en el apartado 4.1.2). Los tratamientos se aplicaron cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% (a las 48 h de haber sembrado las células, aproximadamente). Para ello, se aspiró el medio de cultivo celular de cada pozo y se aplicaron concentraciones de acuerdo a lo requerido para cada ensayo (0.1, 1, 2, 3, 4 y 5 mmol/L de aceite estercúlico diluido en etanol absoluto grado analítico al 1%), en cada pozo se depositaron 500 μL de medio. Como referencia negativa se utilizó medio de cultivo con 1% de etanol y se agregaron dos controles más conteniendo aceite de soya y de maíz (0.1, 1, 2, 3, 4 y 5 mmol/L de aceite diluido en etanol al 1%). Los tratamientos se dejaron incubar por 48 h bajo una atmósfera del 5% de CO_2 , 95% de O_2 a 37°C . Después del tiempo de

incubación se aspiraron todos los tratamientos y se adicionó a cada pozo 40 μ L del reactivo MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) a una concentración de 5mg/mL. Posteriormente se incubaron las células en 5% de CO₂, 95% de O₂ a 37°C durante 2 h (Apéndice A)

Finalmente, se añadieron 200 μ L de DMSO (Dimetil sulfóxido) a cada pozo. La lectura de placas se realizó a 595 nm utilizando un lector Beckman Coulter (DTX 880, Multimode Detector). La viabilidad se calculó en un procesador de hojas de cálculo y para cada viabilidad se dividió la densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica de su testigo correspondiente, los resultados se expresaron en porcentajes.

De los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación, se procedió a elegir las dos líneas que presentaron mayor sensibilidad a la presencia del aceite estercúlico.

4.2.4 Ensayos de viabilidad en células PC-3, LnCaP, RWPE1 y obtención de la concentración inhibitoria media en células PC-3.

Después de los estudios preliminares, se eligió trabajar con las líneas de cáncer de próstata PC-3 y LnCap, además de dos líneas sanas: RWPE1 que modela epitelio de próstata sano y PrSC que es un modelo de estroma de próstata sano. La viabilidad se midió mediante ensayos de MTT como se describió anteriormente, utilizando aceite estercúlico a 1, 2, 3 y 4 mM diluido en medio con etanol al 1% (marca Sigma-Aldrich grado analítico). Para el cálculo de la concentración molar de ácido estercúlico en el aceite estercúlico, se determinó el número de moles que se tenía por litro de aceite estercúlico y se realizaron las diluciones para tener la concentración molar deseada. Para los ensayos realizados con aceite de soya y de maíz, se agregaron los mismos μ L que de aceite estercúlico diluidos en 1% de

etanol. El apéndice G muestra el volumen utilizado para preparar cada dilución de aceite de soya, maíz y estercúlico. En el apéndice H se explican las formas en que se calcularon los resultados de viabilidad y la IC_{50} .

4.2.5 Efecto del aceite estercúlico en el ciclo celular de PC-3, LnCaP y RWPE1 por citometría de flujo.

Para profundizar en el efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad celular, se determinó la fase del ciclo celular donde se detiene el crecimiento de las células, así como el efecto pro-apoptótico del aceite estercúlico.

Se cultivaron las células en frascos de cultivo de 25 mL, con 30,000 células por frasco con tal medio de cultivo correspondiente (indicado en la Tabla 5.1). Una vez que alcanzaron un 80% de confluencia, se añadieron los tratamientos: aceite estercúlico 4 mM, aceite de soya 4 mM, etanol al 1 % como testigo negativo, y medio de cultivo sin ningún compuesto, como testigo. Los tratamientos se dejaron incubando 48 h, al cabo de los cuales se aspiraron los medios de cultivo usando pipetas Pasteur acopladas a un sistema de vacío, y se adicionaron 1.5 mL de medio de cultivo con tripsina al 0.05% a cada frasco para desprender las células adheridas de la superficie de crecimiento. Los frascos de cultivo se colocaron 3 min en la incubadora a 37° para activar la tripsina y facilitar la disgregación celular, posteriormente, las células se colocaron en tubos de 2 mL con 50 μ L de SFB (suero Fetal Bovino) y 450 μ L de medio. Se separaron las células por centrifugación (en un equipo Mini spin Plus; 1500 rpm, 2 min, 25°C), el sobrenadante se retiró con cuidado y el paquete celular se suspendió en 2 mL del medio correspondiente para cada línea celular.

Las células suspendidas se utilizaron para el análisis de ciclo celular, utilizando un kit BD cycletest™ Plus DNA Kit, que contiene los reactivos necesarios para aislar y teñir el núcleo celular de tejido congelado o células en suspensión, permitiendo caracterizar la distribución de las fases del ciclo celular. La metodología de marcaje

de ciclo celular se describe con detalle en el apéndice B. Los resultados obtenidos de las lecturas en el citómetro de flujo BD FACS Aria™ Cell sorter de BD Biosciense fueron analizados con el software Flow Jo 2.0 y expresados como porcentajes.

4.2.6 Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células PC-3, LnCaP y RWPE1 por citometría de flujo.

Las células suspendidas (como se indica en el apartado anterior) se utilizaron también para determinar el porcentaje de células en apoptosis, utilizando el kit FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis FITC annexin V/PI para citometría de flujo de Thermo Fisher scientific. La descripción de la metodología aplicada en esta etapa de la investigación se describe en el apéndice C. Los resultados obtenidos de las lecturas en el citómetro de flujo BD FACS Aria™ Cell sorter de BD Biosciense y analizados con el software Flow Jo 2, expresándolos como porcentajes.

4.2.7 Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de Estearoil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1 por ensayos de Q-PCR

Para realizar la Q-PCR, primero se extrajo el RNA con el método de Trizol y se verificó su integridad mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Apéndice D). Con el RNA se sintetizó un cDNA con el kit de un solo paso de Thermo scientific RevertAid First strand cDNA synthesis (Apéndice D), y se utilizó para finalmente hacer el ensayo de PCR cuantitativo con el kit TaqMan Gene Expression Master Mix de Applied Biosystems. Para ello, primero se realizó la mezcla en un tubo de 2 mL por cada muestra, con 5µL de Master Mix, 4.5 µL de Agua DEPC y 0.5 µL de sonda a 20 X. Se utilizó la sonda H01682761_m1 de Applied Biosystems de México para SCD y la sonda ab85378 de Abcam para GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) que fue utilizado como el gen constitutivo en los ensayos). Se

colocaron 10 μ L de la mezcla anterior a cada pozo de la placa para PCR y se agregó por cada pozo 1 μ L de cDNA correspondiente, se selló la placa y se centrifugó a 3500 rpm durante 2 min. Se incubó la placa 3 min a 94°C seguido de 35 ciclos: desnaturalización (94°C por 45 s), alineamiento (60°C por 1 min), y polimerización (72°C por 1 min). Finalmente se incubó a 72 °C por 10 min y se dejó a 4°C. El ensayo se realizó con un equipo Quant Studio Real Time PCR y su software correspondiente.

4.2.8 Efecto del aceite estercúlico sobre los niveles de Estearoil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1 mediante ensayos de Western Blot

Para la extracción de proteínas de las células cultivadas, éstas fueron cosechadas retirando el medio de cultivo y añadiendo 1 mL de RIPA (sc-24948), se agitó suavemente durante 60 min a 4°C. Se retiraron las células con un raspador de células y se transfirió el lisado a un tubo de microcentrifuga de 2 mL. Se centrifugó el lisado a 9, 500 xg durante 30 min a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante, se añadió 1 μ L de inhibidor de proteasas por cada 100 μ L del lisado y se almacenó a -20°C.

Las proteínas se cuantificaron utilizando un método basado en fluorescencia de acuerdo al protocolo del Kit EZQ Protein Quantitation de Invitrogen; se utilizó una curva estándar con ovoalbúmina (Apéndice E). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % y se transfirió a membrana PVDF de 5cm por 7cm (Apéndice E). Se realizó la transferencia en un sistema semi-Dry Transfer de Bio Rad y se verificó tiñendo la membrana con rojo Ponceau. La lectura se realizó en un equipo ChemiDoc XRS+ con software Image Lab 6.0, los tiempos de exposición fueron de 30 s capturando imágenes cada 3 s. El análisis de las bandas se realizó con el software Image J 5.2.

4.2.9 Efecto del aceite estercúlico sobre el Índice de desaturación como indicador de la actividad de Esteroil CoA Desaturasa en células PC-3, LnCaP y RWPE1

En esta etapa de la investigación se sembraron 100,000 células en frascos de 25 cm² y se trataron con aceite estercúlico 4 mM, aceite de soya 4mM, aceite de maíz 4mM y un testigo negativo que tenía medio de cultivo al 1% de etanol. Las células fueron cosechadas y la extracción de los lípidos celulares se realizó por el método de Bligh and Dyer modificado para la extracción de lípidos celulares (Pelicano *et al.*, 2015) (Apéndice F).

Posteriormente se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos para ser inyectados en un equipo CG-EM y obtener el perfil lipídico, con los métodos descritos en las secciones 4.2.1 y 4.2.2. Los índices de desaturación se calcularon por la relación de los porcentajes de 16:1/16:0 y 18:1/18:0 de cada una de las muestras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Composición del aceite estercúlico, aceite de soya y aceite de maíz.

Se analizó la composición de ácidos grasos de cada aceite utilizado para hacer los cálculos del aceite necesario para obtener las concentraciones molares a utilizar en cada ensayo. Además del aceite estercúlico, se trabajó con aceite de soya y de maíz para comparar los efectos de un aceite rico en ácido estercúlico y dos aceites que carecen del ácido graso ciclopropenoide. Los resultados se muestran en la Tabla 5.1

TABLA 5.1: Composición de ácidos grasos del aceite estercúlico, de soya y de maíz.

Ácido graso	Aceite estercúlico %	Aceite de soya %	Aceite de maíz %
Palmítico (16:0)	18	11.5	10
Palmitoleico (16:1)	3	0.1	0.7
Esteárico (18:0)	4	4.2	3
Oleico (Cis) (18:1)	26	23.1	31.5
Linoleico (18:2)	10	53.4	48
Estercúlico	34	0	0
Otros	6	7.65	6.8

Se observó que el ácido estercúlico fue el componente principal del aceite que lleva su nombre con un 34%, seguido del oleico con un 26% y del palmítico con 18%. En lo referente a la inhibición de SCD, el ácido estercúlico y el oleico tienen efectos opuestos (Gómez *et al.*, 2003), esto es de importancia para entender el efecto del aceite en la proliferación celular y en la determinación de la IC₅₀. Para los aceites de soya y de maíz, el ácido más abundante fue el linoleico con 53.4% y 48%, respectivamente.

5.2 Resultados de los ensayos de viabilidad en células cancerosas y sanas tratadas con aceite estercúlico

Para medir el efecto citotóxico y antiproliferativo de un fármaco o producto natural, los ensayos de viabilidad son un protocolo necesario y el método de MTT es usado frecuentemente. Este paso se hizo necesario para definir las líneas celulares con mayor sensibilidad a la presencia del ácido estercúlico.

Se realizaron pruebas preliminares de viabilidad en modelos celulares que representaban los tipos de cáncer de mayor incidencia en México: cáncer de próstata (PC-3 y LnCap), cáncer de mama (MCF-7 y BT-20), cáncer cervical (HeLa), cáncer de colon (CaCo2), cáncer de hígado (HepG2), cáncer de pulmón (H460) y osteosarcoma (U2OS) (SSA, 2018). Después de probar distintas concentraciones y tiempos para estandarizar los ensayos, las pruebas de viabilidad se realizaron utilizando aceite estercúlico disuelto en el medio de cultivo a concentración de 4 mM y se utilizó etanol al 1% como vehículo. Como testigo en cada ensayo se trabajó con medio de cultivo y 1% de etanol. La Figura 5.1 muestra el porcentaje de viabilidad de cada línea celular obtenido en cada ensayo independiente, después de la incubación con aceite estercúlico por 48 h.

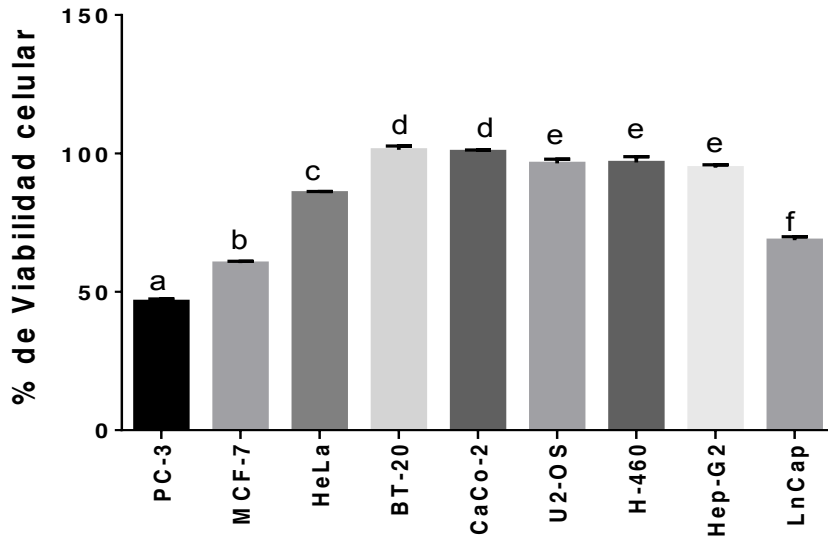


FIGURA 5.1 Efecto del ácido estercúlico 4mM sobre distintas líneas celulares de cáncer tratadas durante 48 h. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.1 se observa que la línea de cáncer de próstata PC-3 fue la más afectada en la viabilidad celular ($46\% \pm 0.86$), seguida de la línea de cáncer de mama MCF-7, con una viabilidad del $60\% \pm 0.62$, y la de cáncer de próstata dependiente de andrógenos LnCaP, con una viabilidad de $68\% \pm 1.2$. Menor afectación tuvieron las líneas de cáncer cervical HeLa ($86\% \pm 0.46$), la de hepatocarcinoma Hep-G2 ($95\% \pm 1.26$), la línea de cáncer de pulmón H-460 ($96\% \pm 1.8$), y las células de osteosarcoma U2-Os ($96\% \pm 1.24$). Finalmente, el aceite estercúlico 4 mM no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células de cáncer de mama independiente de estrógenos BT-20 ($100\% \pm 1.86$), y la línea de cáncer de colon CaCo-2 ($100\% \pm 1.65$). Estos resultados permitieron ver que no todas las líneas celulares pueden ser afectadas por la presencia del aceite estercúlico.

Para profundizar en el análisis, se eligió la línea PC-3, ya que fue en la que se observó un mayor efecto y se eligió también la línea de células LnCaP debido a que, mientras PC-3 representa una etapa tardía del cáncer de próstata donde no hay

respuesta a andrógenos y hay metástasis, LnCaP representa una etapa inicial donde el cáncer de próstata prolifera con menor rapidez, aun responde a andrógenos y no hay metástasis.

5.2.1 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en la línea celular PC-3

PC-3 es una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos que sirve para modelar un cáncer metastásico en columna vertebral; para continuar con el estudio, se utilizaron concentraciones de 2, 3, 4 y 5 mM de aceite estercúlico, utilizando un testigo tratado únicamente con medio de cultivo y etanol al 1%.

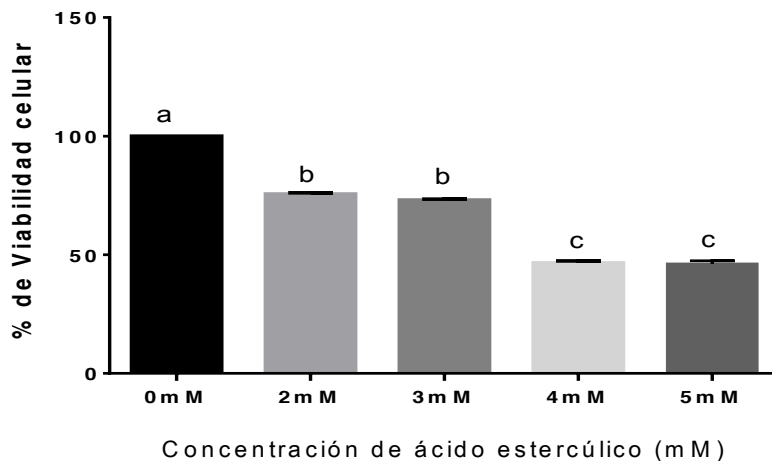


FIGURA 5.2 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células PC-3 a 48 h de tratamiento. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.2 se puede observar que la viabilidad celular disminuye conforme se aumenta la concentración de aceite estercúlico, hasta llegar a $46.1\% \pm 1.27$ con 5mM de aceite. Aunque todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo, entre las concentraciones de 2 y 3 mM no hubo diferencias significativas y tampoco entre los tratamientos a 4 y 5 mM, por lo que se decidió utilizar

concentraciones de 3.4, 3.6, 3.8 y 4 mM para encontrar una concentración inhibitoria media (IC₅₀). Estos ensayos se realizaron únicamente en la línea celular PC-3 debido a que fue la que presentó viabilidad por debajo del 50%. La IC₅₀ es un parámetro frecuentemente utilizado para determinar el potencial de una sustancia como inhibidor de la función biológica o bioquímica específica (Melo *et al.*, 2015) y fue necesario tener este parámetro para comparar el efecto del aceite estercúlico con el de otros fármacos. Los resultados se muestran en la Figura 5.3.

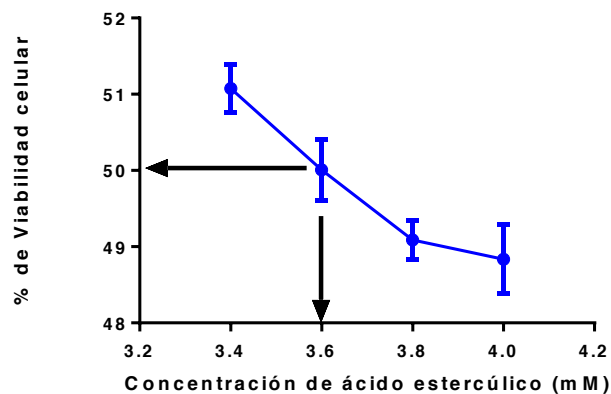


FIGURA 5.3 Concentración inhibitoria media (IC₅₀) del aceite estercúlico en células PC-3.

Se utilizó un modelo lineal para la determinación de la IC₅₀ del aceite estercúlico por ser el que más se ajustó con una R² de 0.98. El valor de la IC₅₀ se ubicó en 3.6 mM (± 0.89). El resultado obtenido no se pudo comparar con la literatura debido a que no se ha reportado un IC₅₀ para aceite estercúlico ni para ácido estercúlico. Lo que si se ha reportado son estudios en otros ácidos grasos como el eicosapentaenoico (EPA) que fue probado en 15 diferentes líneas celulares de cáncer y se encontró la IC₅₀ entre 23 y 96 μM (Palakurthi *et al.*, 2000). También hay reporte de la actividad citotóxica de ácidos grasos omega 3 y 6 en células de cáncer de próstata PC-3 que muestran que, a concentraciones de 150 μM de EPA, de DHA (ácido docosahexaenoico) o de AA (ácido araquidónico), se reduce la viabilidad celular por

debajo del 50% (Villa-Vásquez *et al.*, 2018). Por otra parte, el fármaco Nocodazole tiene una IC₅₀ de 1nM en células PC-3, siendo uno de los más utilizados para alterar la inestabilidad dinámica de los micro túbulos *in vitro* e *in vivo* (Vázquez *et al.*, 1997). En base a los estudios previamente citados, se puede afirmar que la concentración necesaria de ácido estercúlico para inhibir la viabilidad del 50% de las células es alta en comparación con las concentraciones utilizadas de otros fármacos, dicho de otro modo, su efecto antiproliferativo es bajo en comparación con los fármacos inhibidores de SCD. Se debe tomar en cuenta que ácido estercúlico suministrado se encuentra de forma natural en el aceite estercúlico.

Para tener certeza de que el efecto observado era específicamente por la presencia del ácido estercúlico, se realizaron ensayos utilizando aceite de soya y de maíz en la misma cantidad de cada aceite y de etanol que las utilizadas en los tratamientos con estercúlico. La Figura 5.4 muestra los resultados de este ensayo.

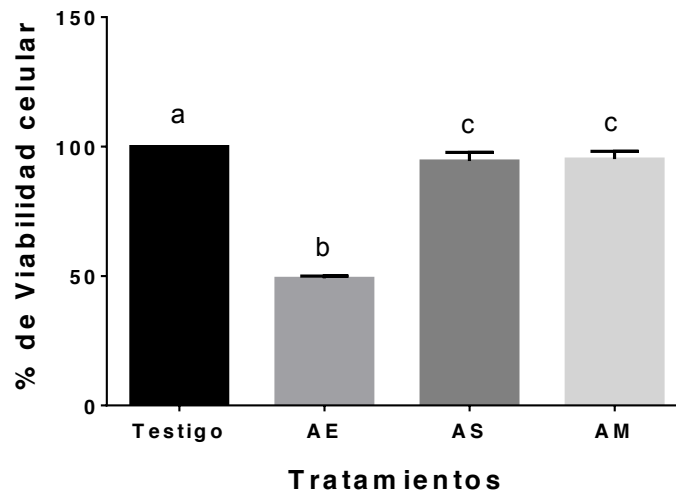


FIGURA 5.4 Efecto de ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en PC-3 a 48 h de tratamiento. As: Aceite de soya. AE: Aceite estercúlico. AM: aceite de maíz. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como puede observarse, la viabilidad de las células PC-3 tratadas con aceite estercúlico fue del 49.1% (± 0.82), mientras que las que fueron tratadas con aceite de soya tuvieron una viabilidad de 94.43% (± 3.19), y con aceite de maíz tuvieron viabilidad del 95.15% (± 2.87). Este resultado sugiere que la disminución de la viabilidad en las células PC-3 se debe a la presencia de ácido estercúlico en un 34% en el aceite estercúlico, ya que los aceites de soya y de maíz no pudieron bajar la viabilidad más allá de un 5.6%.

5.2.2 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en la línea celular LnCaP

Para tener un panorama mejor del efecto del aceite estercúlico sobre el cáncer de próstata, después de estudiar el efecto sobre células de cáncer de próstata en etapa final, se trabajó con el modelo de cáncer de próstata en etapa inicial usando como modelo a la línea celular LnCaP, utilizando concentraciones de 2, 3, 4 y 5 mM.

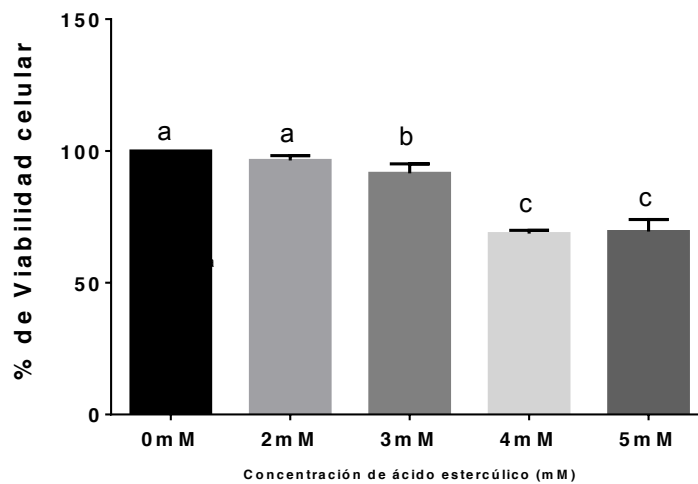


FIGURA 5.5 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células LnCaP a 48 h de tratamiento. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

La Figura 5.5 muestra que la viabilidad disminuyó al aumentar la concentración de aceite, hasta el 69.39% (± 4.4) con 5mM. Este resultado es importante considerando que es una línea celular que modela una etapa inicial del cáncer de próstata y su proliferación es menos rápida que las células PC-3. En esta etapa del cáncer de próstata, se aplican terapias hormonales para disminuir la proliferación y se podría aprovechar el efecto del aceite estercúlico como coadyuvante en el tratamiento hormonal.

Al igual que en PC-3, se realizaron ensayos utilizando aceite de soya y aceite de maíz a 4mM y los resultados se muestran en la Figura 5.6.

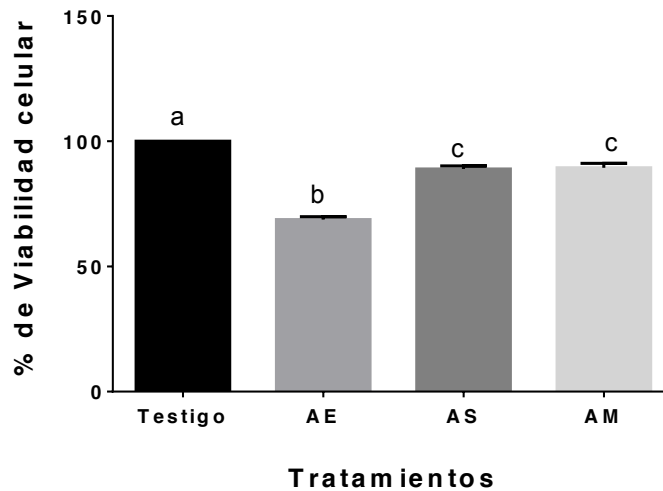


FIGURA 5.6 Efecto del ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en LnCaP a 48 h de tratamiento. As: Aceite de soya. AE: Aceite estercúlico. AM: aceite de maíz. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.6 se observa que el aceite estercúlico disminuyó en mayor proporción la viabilidad celular (hasta el 68.6% ± 1.4), en comparación con el aceite de soya y maíz (88.9% ± 1.2 y 89.4% ± 1.7 , respectivamente), sin diferencia significativa entre ellos, lo que nuevamente sugiere la participación del ácido estercúlico como responsable del efecto inhibitor de la viabilidad celular.

5.2.3 Efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad en las líneas celulares sanas de próstata PrsC y RWPE1.

Al observar el efecto antiproliferativo del aceite estercúlico sobre las líneas celulares cancerosas PC-3 y LnCaP, sobre todo en PC-3 que es de rápida proliferación, se decidió evaluar el efecto en dos líneas celulares sanas: RWPE1 y PrsC.

RWPE1 es un modelo celular de epitelio de próstata sano del que se han derivado diversas líneas para investigación de hiperplasia prostática benigna (HPB) (Bello *et al.*, 1997). PrsC representa un modelo de células prostáticas estromales sanas y se ha utilizado para estudiar la regulación estromal del cáncer de próstata por las enzimas de diferentes rutas metabólicas (Ashida *et al.*, 2017). Se evaluaron ambas líneas utilizando nuevamente medio de cultivo y aceite estercúlico con etanol al 1% como vehículo. Se incluyó un testigo tratado únicamente con medio de cultivo y vehículo al 1%. Se aplicaron concentraciones de 2, 3, 4 y 5 mM de aceite estercúlico para comparar su efecto sobre la viabilidad celular. Los resultados se muestran en las Figuras 5.7 y 5.8.

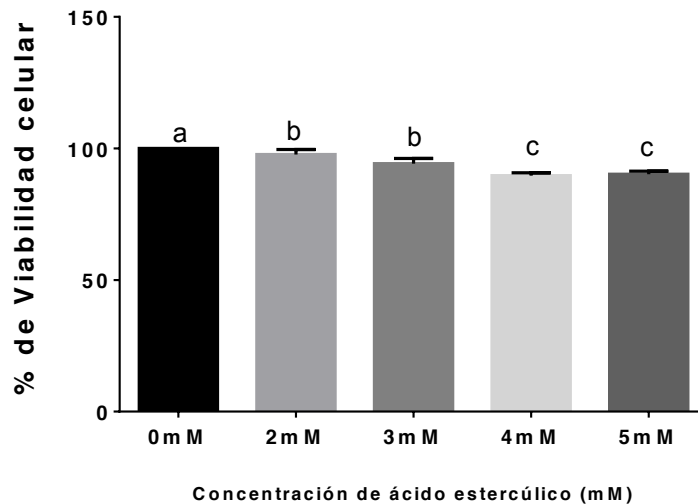


FIGURA 5.7 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células RWPE1 a 48 h de tratamiento. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.7 se observa que la viabilidad de células epiteliales de próstata sana RWPE1 disminuyó ligeramente respecto al testigo al utilizar 2 mM ($97.66\% \pm 1.88$) y 3 mM ($94.19\% \pm 1.96$). Con 4 y 5 mM la viabilidad baja un 10%, quedando en $89.65\% \pm 1.08$ con 4mM y $90.19\% \pm 1.16$ con 5 mM. Aunque todos los tratamientos tienen diferencia estadísticamente significativa con el testigo, entre los tratamientos a 2 y 3 mM no hay diferencia y tampoco la hay entre los tratamientos a 4 y 5 mM. Aunque la disminución de la viabilidad es aproximadamente del 10% en células sanas, se debe tener en cuenta que la misma dosis tiene un efecto antiproliferativo cercano al 50% en un modelo de cáncer de próstata bastante agresivo como el de la línea PC-3.

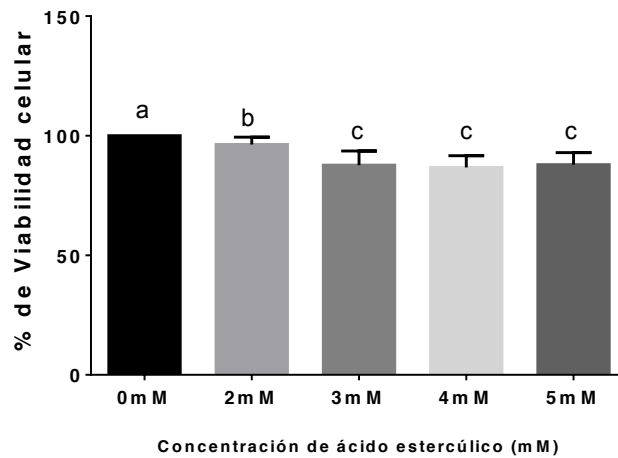


FIGURA 5.8 Efecto del aceite estercúlico a distintas concentraciones sobre la viabilidad de células PrSC a las 48 h de tratamiento. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Con respecto a las células sanas PrSC, la Figura 5.8 muestra que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes al testigo, y la viabilidad celular disminuyó hasta un 87.7 % con aceite estercúlico a 3, 4 y 5 mM, sin diferencias significativas entre ellos.

Se evaluó también el efecto del aceite de soya y de maíz sobre la viabilidad en las líneas celulares sanas. Los resultados se muestran en las Figuras 5.9 y 5.10.

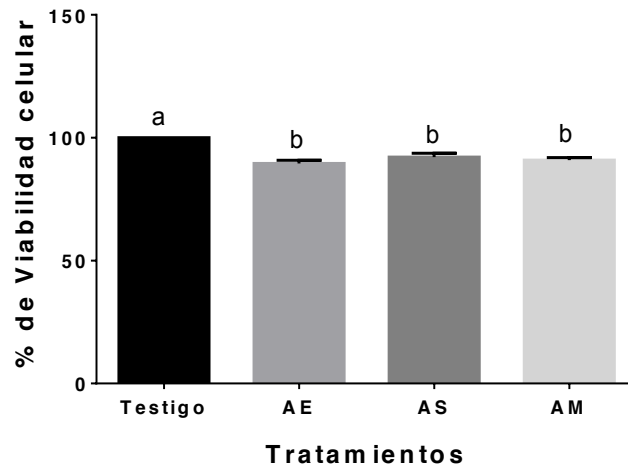


FIGURA 5.9 Efecto del ácido estercúlico 4mM, aceite de soya y aceite de maíz sobre la viabilidad celular en RWPE1. As: Aceite de soya. AE: Aceite estercúlico. AM: aceite de maíz. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Con respecto a la línea RWPE1, la viabilidad celular se encontró entre el 92.08% (± 1.49) con aceite de soya y el 89.52% (± 1.23) con aceite estercúlico, pero sin diferencias significativas entre los tratamientos con los tres aceites. Los resultados anteriores indican que una disminución del 10% en la viabilidad celular es característico en esta línea celular cuando se aplica alguna combinación de ácidos grasos y no es un efecto exclusivo del aceite estercúlico

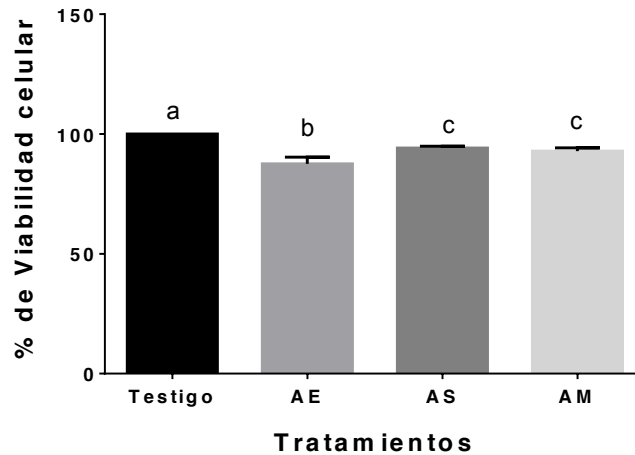


FIGURA 5.10 Efecto del aceite estercúlico, de soja y de maíz a 4 mM sobre la viabilidad celular en PrSC a 48 h de tratamiento. As: Aceite de soja. AE: Aceite estercúlico. AM: aceite de maíz. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.10 se muestra que la viabilidad de PrSC disminuyó con el aceite estercúlico, llegando al 87.52% (± 2.81), mientras que con el aceite de soja y de maíz fue de al 94.16% (± 0.76) y 92.88% (± 1.37), respectivamente. En los tres casos se presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al testigo. Nuevamente vale la pena mencionar que la viabilidad se ve afectada en un 12.48% en la línea sana PrSC mientras que el efecto sobre una línea metastásica es cercano al 50%.

En la Figura 5.11 se muestran reunidos los resultados de los ensayos de viabilidad de cada línea celular.

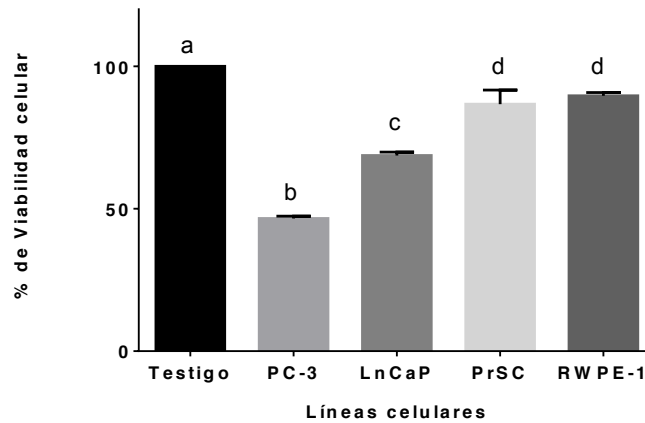


FIGURA 5.11 Efecto del aceite estercúlico a 4mM en células PC-3, RWPE1, PrSC y LnCaP a 48 h de tratamiento. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se observa que el aceite estercúlico a 4 mM disminuye la proliferación de células metastásicas PC-3 hasta el 46.55% (± 0.85), y de las células cancerosas LnCaP al 68.67% (± 1.19), mientras que las células sanas RWPE1 y PrSC proliferan al 89.65% (± 1.12) y 86.72% (± 4.91), respectivamente. Como se mencionó en párrafos anteriores, una disminución aproximada del 10 % parece ser normal al utilizar cualquier tipo de aceite y el efecto del aceite estercúlico observado en las líneas sanas está muy cercano a lo normal, mientras que el impacto sobre células cancerosas es significativo para disminuir la proliferación. El efecto del aceite estercúlico sobre la viabilidad celular se explica por la inhibición de la SCD, que juega un papel importante en la síntesis de membranas durante la proliferación celular, y cuya expresión se encuentra incrementada en células tratadas con factores de crecimiento, al igual que la enzima ácido graso sintasa, y en algunas células cancerosas (Demoulin *et al.*, 2004).

5.3 Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

5.3.1 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea PC-3

Después de comprobar que el aceite estercúlico tenía potencial para inhibir la proliferación en células cancerosas de próstata hasta en un 50%, mientras que en las células sanas el efecto no alcanzaba más de un 10%, se realizaron ensayos de citometría para observar si el ciclo celular se estacionaba en alguna etapa en particular y poder comparar con el efecto de fármacos utilizados en tratamientos de cáncer. Estas observaciones eran necesarias porque los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer son diseñados para interferir con el crecimiento y/o proliferación de células cancerosas (Vásquez *et al.*, 1997). Algunos fármacos son pro-apoptóticos actuando sobre una cascada de reacciones de cisteín-proteasas (García-Álvarez *et al.*, 2010), otros actúan sobre la anhidrasa carbónica (AC), una enzima importante en la regulación del pH celular, otros inducen daños al ADN promoviendo apoptosis (Gupta *et al.*, 2013), otros inhiben las vías de señalización de Wnt- β -catenina cuya participación es importante en la proliferación, migración y división celular (Lee *et al.*, 2010), algunos fármacos regulan proteínas oncogénicas (Wang *et al.*, 2012), y otros inhiben la polimerización de microtúbulos o modifican la disponibilidad de biomoléculas críticas para la proliferación de la célula cancerosa (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2014). Fue necesario conocer si el aceite estercúlico tenía potencial para arrestar el ciclo celular en alguna fase.

El efecto del aceite estercúlico 4 mM sobre la morfología y el ciclo celular de las células PC-3 fue comparado con el del nocodazol 1 μ M (N), que es un fármaco antineoplásico que característicamente arresta el ciclo celular en G2, y con la combinación de nocodazol 1 μ M y ácido estercúlico 4mM (N+AE).

En la Figura 5.12 se muestran los cambios morfológicos en las células PC-3 con los distintos tratamientos aplicados para el análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

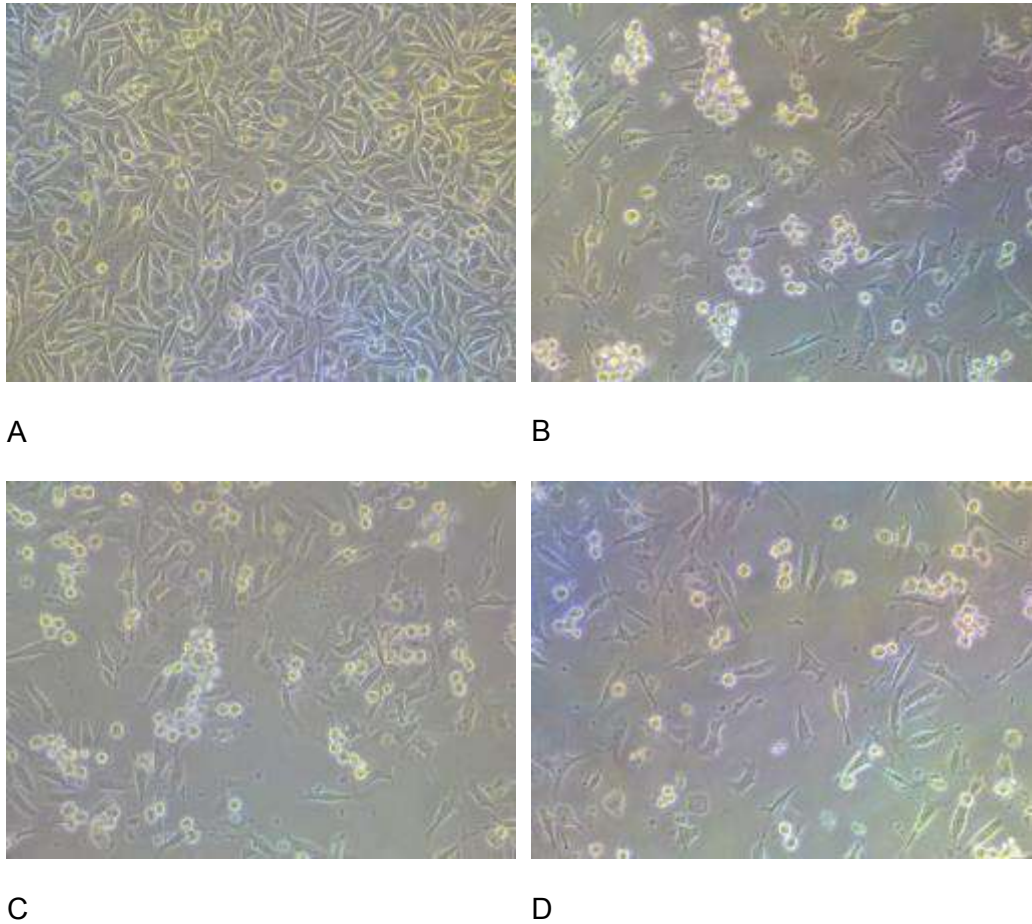


Figura 5.12: Cambios en la morfología de las células PC-3 a las 48 h de tratamiento. Fotos 20X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Células sin tratamiento (Testigo). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1µM (N). D) Nocodazol 1µM y ácido estercúlico 4mM (N+AE).

En la Figura 5.12 A se observa la morfología característica de las células PC-3 del tratamiento testigo; estas células se encontraban en su mayoría en G1 y su confluencia es mayor que en los demás tratamientos. En la Figura 5.12 B se muestran las células tratadas con aceite estercúlico 4 mM; es notable la disminución de la confluencia y la pérdida adherencia a la placa de cultivo. En la Figura 5.12 C se muestran las células tratadas con nocodazol 1µM; se observa una morfología similar a las células tratadas con aceite estercúlico, con una confluencia ligeramente menor. En la Figura 5.12 D se observan las células tratadas con aceite estercúlico y nocodazol; la confluencia es menor que en el resto de los tratamientos, pero las

características morfológicas son similares a las de los tratamientos por separado. El nocodazol (metil N-(5-tenoil-2-benzimidazolil) carbamato) se utilizó como una referencia positiva ya que es un compuesto antineoplásico que arresta el ciclo celular en G2; interfiere con la mitosis ya que se une a la tubulina e interfiere con la polimerización de los microtúbulos del citoesqueleto. Con esto, además de arrestar en G2, tiene la capacidad de inducir apoptosis (Blajeski *et al.*, 2002). Las células tratadas con aceite estercúlico presentaron una confluencia y morfología muy similar a las que se trataron con nocodazol. Los perfiles de distribución celular obtenidos en el ensayo de citometría de flujo aportan mayor detalle para reforzar esta afirmación (Figura 5.13).

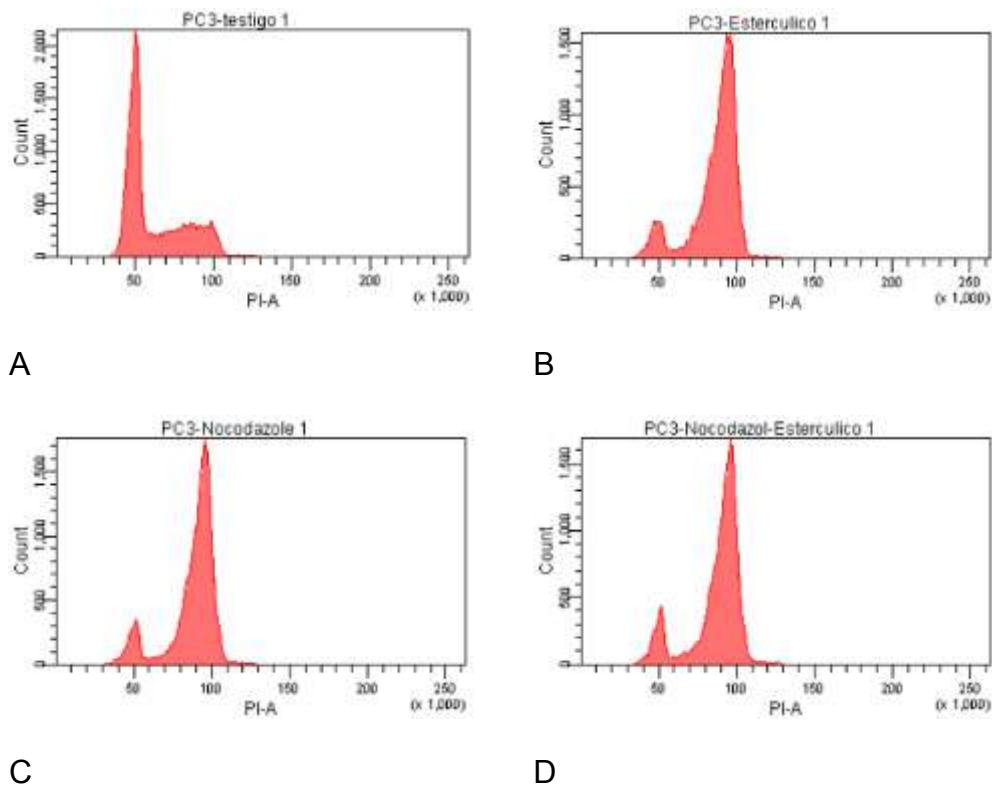


Figura 5.13: Perfiles de distribución de las fases del ciclo celular en PC-3 a las 48 h de tratamiento. A) Células sin tratamiento (Control). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1µM (N). D) Nocodazol 1µM y ácido estercúlico 4mM (N+AE). Se utilizaron 30, 000 células por muestra.

La Figura 5.13 A permite ver que, en condiciones normales de cultivo, la mayoría de las células PC-3 permanecen en fase G1 mientras que, en el resto de los tratamientos, el mayor número de células se encuentra en G2. Nuevamente, es importante señalar que el tratamiento con ácido estercúlico 4mM (Figura 5.13 B) genera un histograma muy similar al que se obtiene con nocodazol 1 μ M (Figura 5.13 C) y con la combinación de ambos (Figura 5.13 D). Esto es congruente con lo que se aprecia en las fotografías tomadas al microscopio (Figura 5.12). En la Figura 5.14 se muestran los resultados cuantitativos de los histogramas, calculados con el software ModFit LT 4.1.7 (Wn).

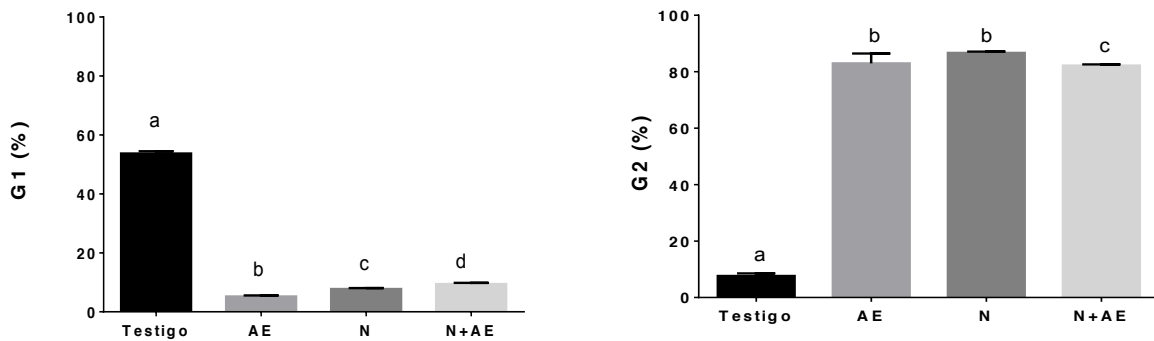


FIGURA 5.14: Porcentaje de células PC-3 en fase G1 y G2 a las 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. N: Células con medio de cultivo y nocodazol 1 μ M. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y nocodazol 1 μ M. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.14 se aprecia que todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas en relación a las células testigo, que presentaron un 53.68% (± 0.79) de células en G1 y un 7.64% (± 0.91) en G2. En cambio, las células tratadas con ácido estercúlico 4mM tuvieron un 5.19% (± 5.34) de células en G1 y 82.96% (± 3.47) en G2, similar a las células tratadas con nocodazol 1 μ M, con un 7.72% (± 0.32) de células en G1 y un 86.68% (± 0.45) en G2. La combinación de nocodazol 1 μ M y estercúlico 4mM provocó que el 9.4% (± 0.41) de las células quedara en G1 y el

82.17% (± 0.44) permaneciera en G2. Es claro que el aceite estercúlico provoca un arresto del ciclo celular en la fase G2 en la misma proporción que lo hace el nocodazol, al no haber diferencias significativas entre los tratamientos AE y N, sin embargo, mientras el nocodazol actúa inhibiendo la polimerización de microtúbulos para detener la formación del huso mitótico (Dalvai *et al.*, 2010), el efecto del aceite estercúlico se relaciona con la modificación del perfil lipídico que altera la composición de la membrana celular afectando su permeabilidad y reduciendo la disponibilidad de lípidos para la formación de nuevas membranas celulares.

5.3.2 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea LnCaP

En la Figura 5.15 se pueden ver los cambios morfológicos en las células LnCaP con los distintos tratamientos aplicados para el análisis de ciclo celular por citometría de flujo, de igual forma que con las células PC-3.

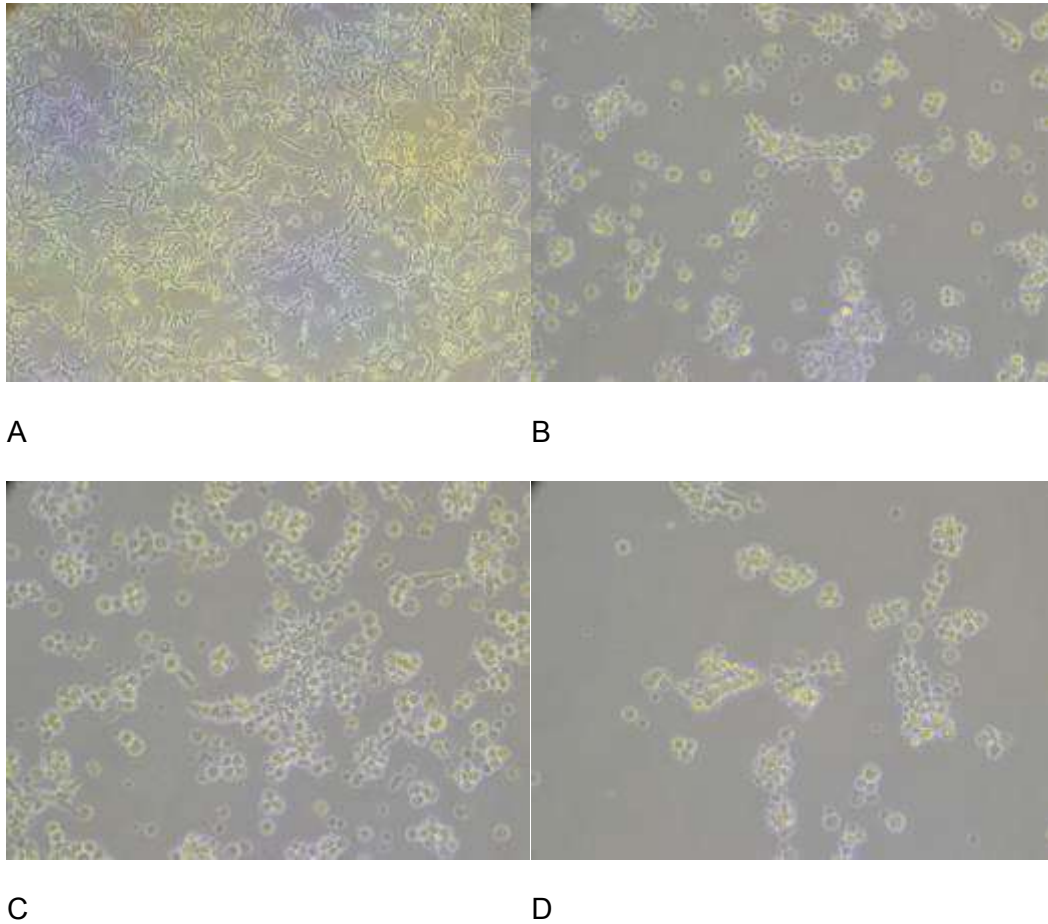


Figura 5.15: Cambios en la morfología de las células LnCaP a las 48 h de tratamiento. Fotos 20X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Células sin tratamiento (Control). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1µM (N). D) Nocodazol 1µM y ácido estercúlico 4mM (N+AE).

En la Figura 5.15 A, las células LnCaP testigo muestran su morfología característica con una confluencia mayor que en los demás tratamientos; la mayoría de las células se encontraban en la fase G1 del ciclo celular. En la Figura 5.15 B se aprecia que el tratamiento con aceite estercúlico provocó una disminución de la confluencia y que las células perdieran adherencia a la placa de cultivo; la morfología de las células adheridas es característica de esta línea celular cuando se tiene una confluencia menor al 30%. En la Figura 5.15 C se observan las células tratadas con nocodazol, con una confluencia ligeramente mayor a la de la Figura anterior, pero con las características similares de morfología de las células adheridas. En la Figura 5.15 D,

se muestra que la combinación de aceite estercúlico y nocodazol provocó una confluencia menor que en el resto de los tratamientos pero con características morfológicas similares a las células tratadas con los dos compuestos por separado. Nuevamente, es importante señalar que el efecto del aceite estercúlico 4 mM y el del antineoplásico nocodazol 1µM fueron similares. Los perfiles de distribución celular en las fases del ciclo obtenidos en el ensayo de citometría de flujo aportan mayor detalle para reforzar esta afirmación (Figura 5.16).

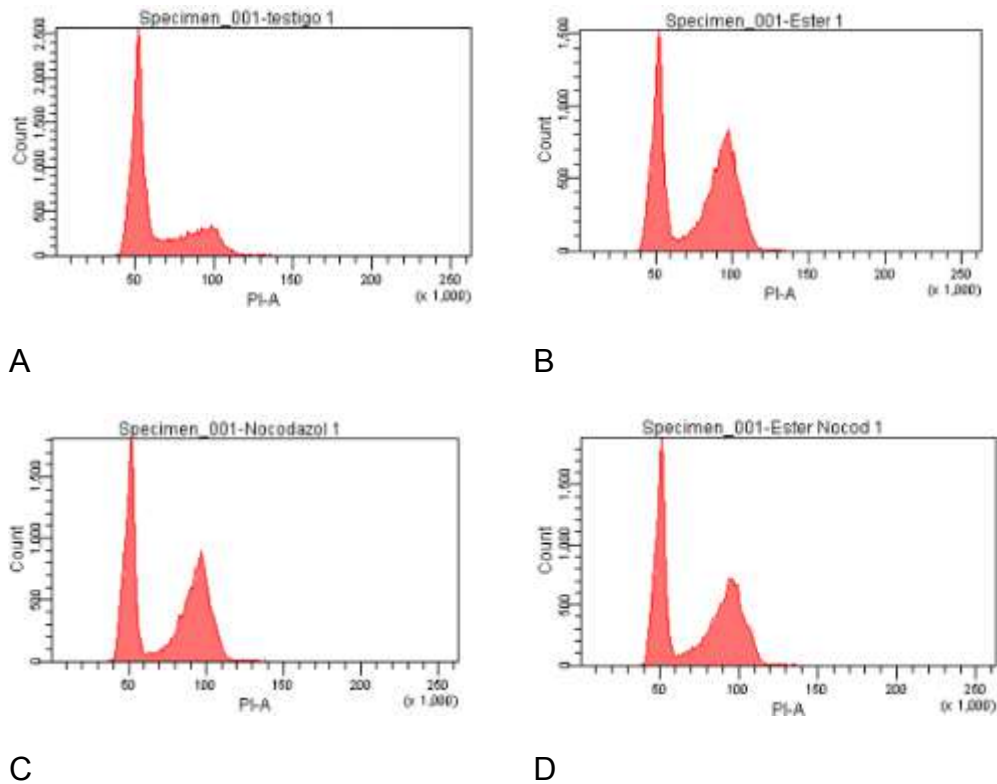


Figura 5.16: Perfiles de distribución en las fases del ciclo celular en LnCaP a las 48 h de tratamiento. A) Células sin tratamiento (Control). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1µM (N). D) Nocodazol 1µM y ácido estercúlico 4mM (N+AE). Se utilizaron 30, 000 células por muestra.

La Figura 5.16 A muestra que la mayoría de las células LnCaP están en fase G1 en condiciones normales, mientras que en el resto de los tratamientos, el mayor número

de células se encuentra en G2. Llama la atención que el tratamiento con ácido estercúlico 4mM (Figura 5.16B) genera un histograma muy similar al que se obtiene con nocodazol 1 μ M (Figura 5.16C) y con la combinación de ambos (Figura 5.16D). Esto es congruente con lo que se aprecia en las fotografías tomadas al microscopio (Figura 5.15). Mediante el software ModFit LT 4.1.7 (Wn) se cuantificaron los histogramas y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 5.17.

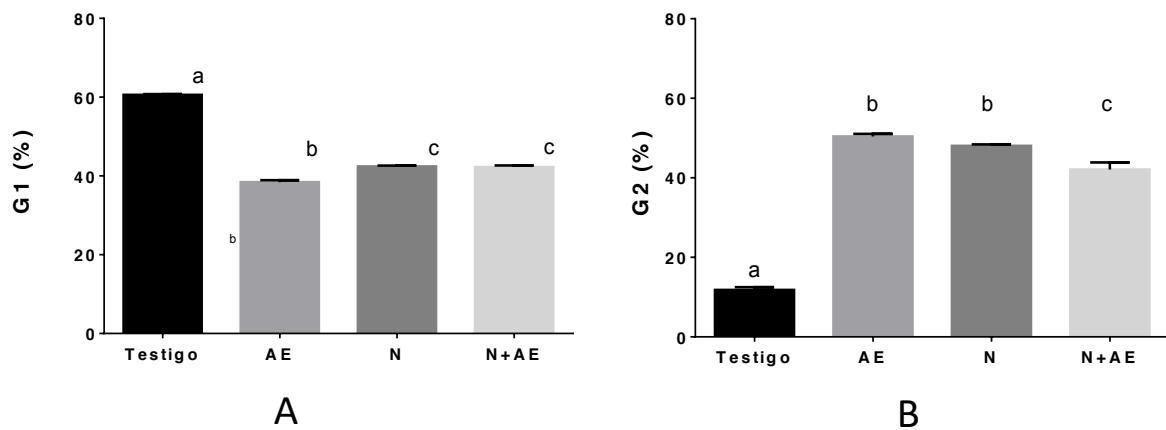


FIGURA 5.17: Porcentaje de células LnCaP en fase G1 (A) y G2 (B) a las 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. N: Células con medio de cultivo y nocodazol 1 μ M. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y nocodazol 1 μ M. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

De acuerdo a la Figura 6.17, cuando las células LnCaP crecieron en medio de cultivo en condiciones normales, el 60.58% (± 0.2) se encontraron en G1 y el 11.8% (± 0.7) en G2. Cuando fueron tratadas con ácido estercúlico 4mM se agruparon el 38.4% (± 0.51) en G1 y el 50.4% (± 0.63) en G2; las que se expusieron al nocodazol 1 μ M mantuvieron el 42.4% (± 0.21) de su población en G1 y el 48.03% (± 0.38) en G2, y la combinación de ácido estercúlico 4mM y nocodazol 1 μ M mantuvo al 42.25% (± 0.42) de las células en G1 y al 42.09% (± 1.76) en G2. Todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente al testigo. El aceite estercúlico arrestó el ciclo celular en

G2 de la misma manera que lo hizo el antineoplásico nocodazol, sin embargo, cuando se aplicaron conjuntamente no se sumaron los efectos. Con esta última observación se confirma que, aunque el aceite estercúlico arresta el ciclo en G2 como lo hace el nocodazol, los mecanismos son distintos.

6.3.3 Efecto del aceite estercúlico sobre el ciclo celular en la línea RWPE1

El efecto del aceite estercúlico 4 mM sobre el ciclo celular fue analizado también en líneas celulares sanas. Los tratamientos fueron los mismos que con las células cancerosas, y sus efectos sobre la morfología celular se muestran en la Figura 5.18.

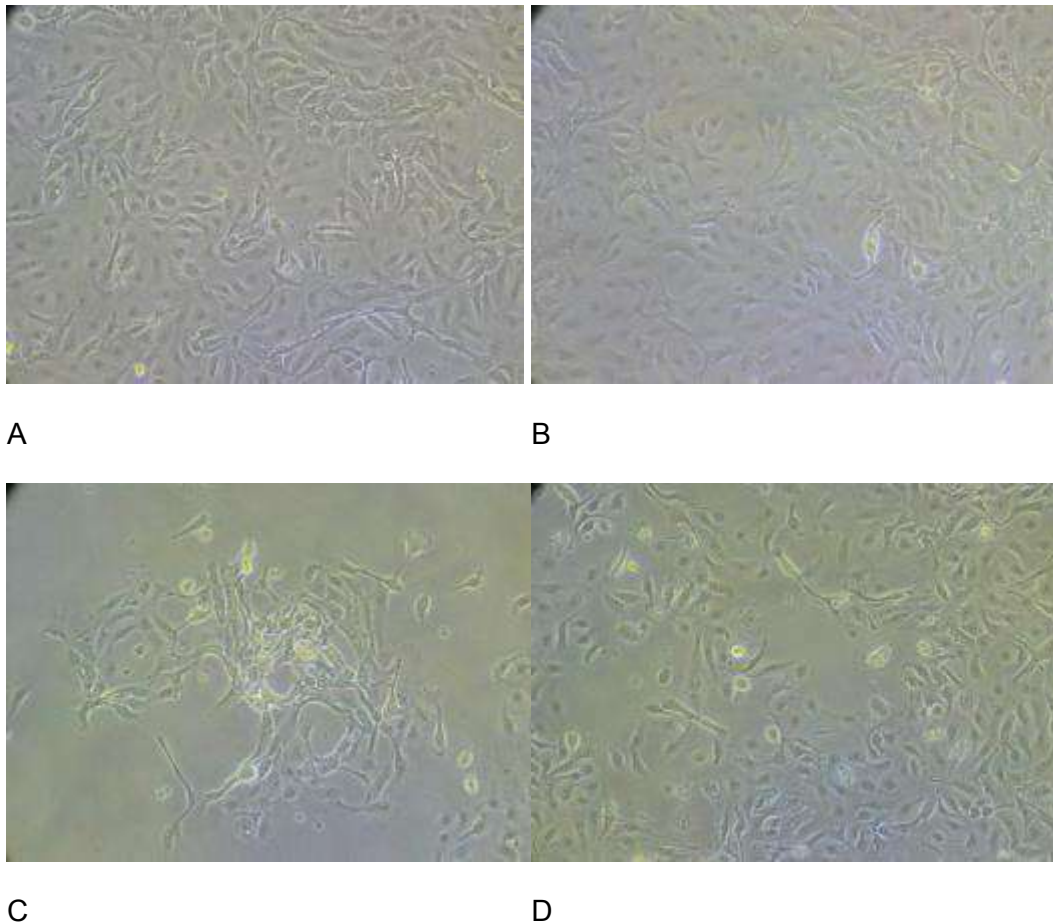


Figura 5.18: Cambios en la morfología de las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento. Fotos 20X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Testigo tratado con medio de cultivo (Control). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1µM (N). D) Nocodazol 1µM y ácido estercúlico 4mM (N+AE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.18 A, las células epiteliales de próstata sana RWPE1 muestran su morfología característica con una confluencia mayor que en los demás tratamientos; estas células se encontraban en su mayoría en la fase G1. En la Figura 5.18 B, en las células tratadas con aceite estercúlico se aprecia una disminución de la confluencia pero las células, en su mayoría, permanecen adheridas a la placa y se conserva su morfología. En la Figura 5.18 C hay una disminución drástica de la población celular al ser tratadas con nocodazol, y las células que se observan aun adheridas a la placa de cultivo mantienen su morfología característica. En la Figura 5.18 D se puede observar que el tratamiento con aceite estercúlico y nocodazol provoca una ligera pérdida de adherencia celular, pero en menor medida que con el tratamiento de nocodazol solo. Por lo tanto, se puede afirmar que el aceite estercúlico no afecta la proliferación celular ni las características morfológicas de las células sanas RWPE1, a diferencia del nocodazol, y que, además, la presencia del aceite estercúlico protege a las células del efecto antiproliferativo del nocodazol. Debido a que se trata de una línea celular sana, este es un efecto favorable para la célula. Los perfiles de distribución celular obtenidos en el ensayo de citometría de flujo aportan mayor detalle para reforzar esta afirmación (Figura 5.19).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

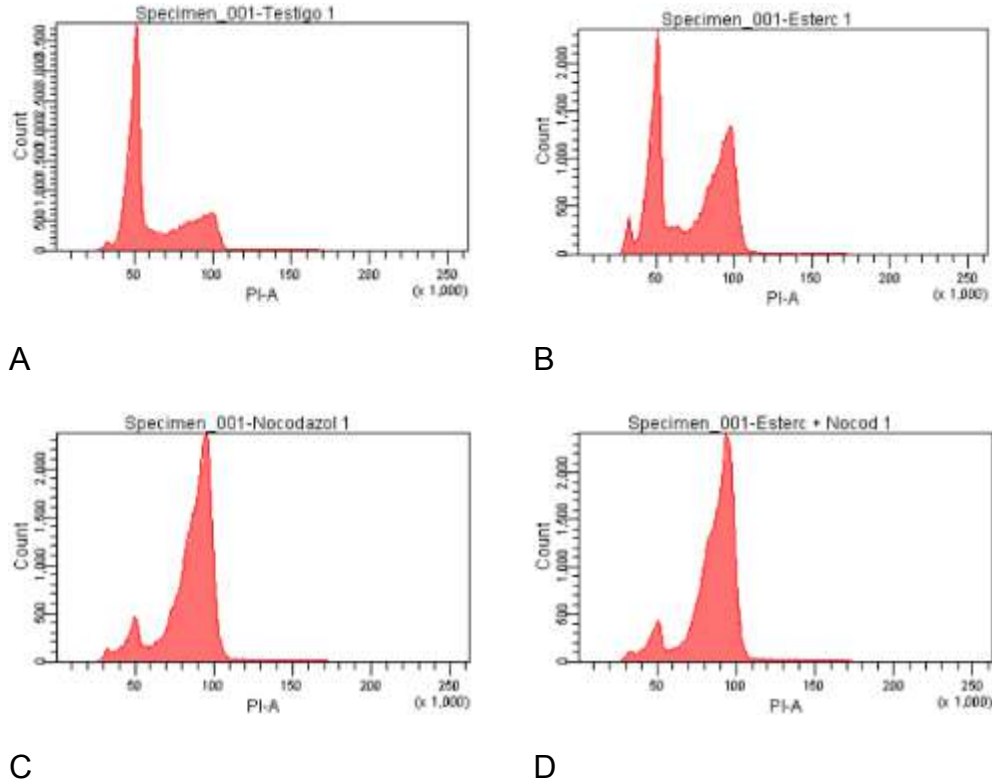


Figura 5.19: Perfiles de distribución del ciclo celular en RWPE1 a las 48 h de tratamiento. A) Células sin tratamiento (Control). B) Ácido estercúlico 4mM (AE). C) Nocodazol 1 μ M (N). D) Nocodazol 1 μ M y ácido estercúlico 4mM (N+AE). Se utilizaron 30, 000 células por muestra.

Nuevamente se observó consistencia entre los histogramas y las fotografías tomadas al microscopio. En la Figura 5.19 A se puede observar que la mayoría de las células RWPE1 se encontraron en fase G1 y un mínimo porcentaje en G2 mientras que en 5.19 B en la células tratadas con aceite estercúlico hay una distribución más equitativa en el número de células en G1 y G2. En las imágenes 5.19 C y D se observa un perfil similar en las células tratadas con nocodazol1 μ M, sin y con aceite estercúlico. Mediante el software ModFit LT 4.1.7 (Wn) se cuantificaron los histogramas y se obtuvieron los resultados de la figuras 5.20.

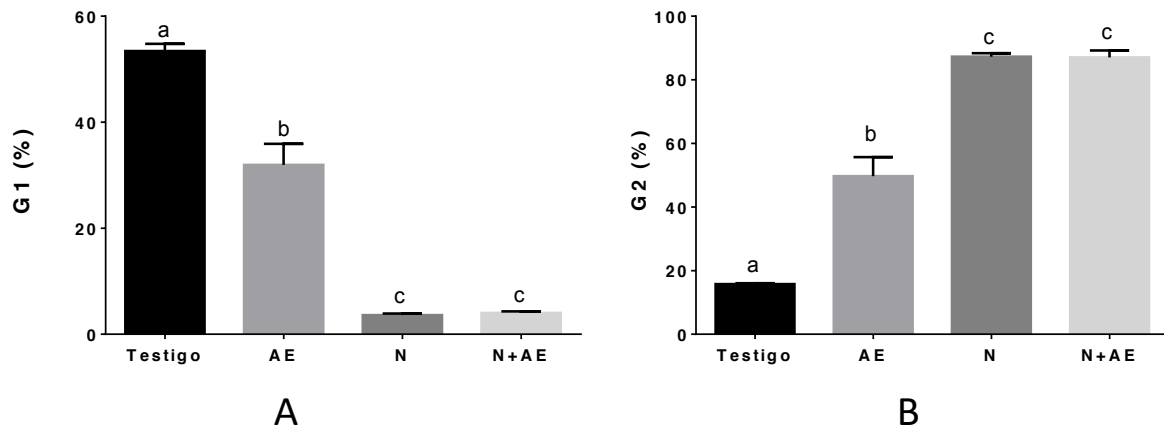


FIGURA 5.20: Porcentaje de células RWPE1 en las fases G1 (A) y G2 (B) a las 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. N: Células con medio de cultivo y nocodazol 1 μ M. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y nocodazol 1 μ M. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Al hacer crecer las células RWPE1 en medio de cultivo únicamente, el 53.42% (± 1.35) se encontraron en G1 y el 15.78% (± 0.24) en G2; el tratamiento con ácido estercúlico 4mM provocó que 31.95% (± 3.97) de las células estuviera en G1 y 49.71% (± 5.96) en G2. Las que se cultivaron con nocodazol 1 μ M tuvieron el 3.6% (± 0.29) de su población en G1 y el 87.26% (± 1.08) en G2, y la combinación entre ácido estercúlico 4mM y nocodazol 1 μ M ubicó al 4.02% (± 0.28) de las células en G1 y al 87.03% (± 2.18) en G2. Todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente al testigo, sin embargo, entre los tratamientos que utilizaron nocodazol 1 μ M y nocodazol 1 μ M con ácido estercúlico 4mM no hubo diferencias significativas. Lo normal es que las células se encuentren mayoritariamente en G1 bajo las condiciones de este ensayo y que el nocodazol las arreste en G2, los tratamientos con estercúlico se encuentran en un punto intermedio entre estas dos situaciones al distribuir menos de células en G1 y más en G2 que el testigo. Es importante aclarar que el ciclo celular puede estacionarse en una fase y no necesariamente entrar en apoptosis. Para una célula cancerosa, no representa una ventaja el hecho de que el ciclo se arreste en G1 o en G2, finalmente, esto depende

de los puntos de testigo sobre los que pueda influir un fármaco o tratamiento, lo importante es que se pueda detener la proliferación celular (Lee *et al.*, 1980). Los ensayos de ciclo celular deben complementarse con los de apoptosis porque el encontrar a las células estacionadas en una fase del ciclo celular no es necesariamente un efecto negativo debido a que se debe interpretar como una respuesta de la célula a un tratamiento y para evaluar su efecto real, se hace necesario medir la expresión de los puntos de testigo en cada fase del ciclo (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2004) y su efecto en cascada (Pearce AK, 2001).

5.4 Análisis de apoptosis por citometría de flujo

5.4.1 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular PC-3

Para complementar los ensayos realizados sobre el efecto del aceite estercúlico en el ciclo celular, se evaluó si, además de arrestar el ciclo en G2, había un efecto apoptótico en las células. En este ensayo se utilizó QBS 1 μ M (2-amino-N-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide) como testigo positivo, debido a que induce apoptosis generando una deformación de las membranas celulares conocida como “blebbing” o vesiculación, que es un proceso previo a la formación de cuerpos apoptóticos (Fadok *et al.*, 1992). El efecto de los tratamientos sobre la morfología celular se muestra en la Figura 5.21.

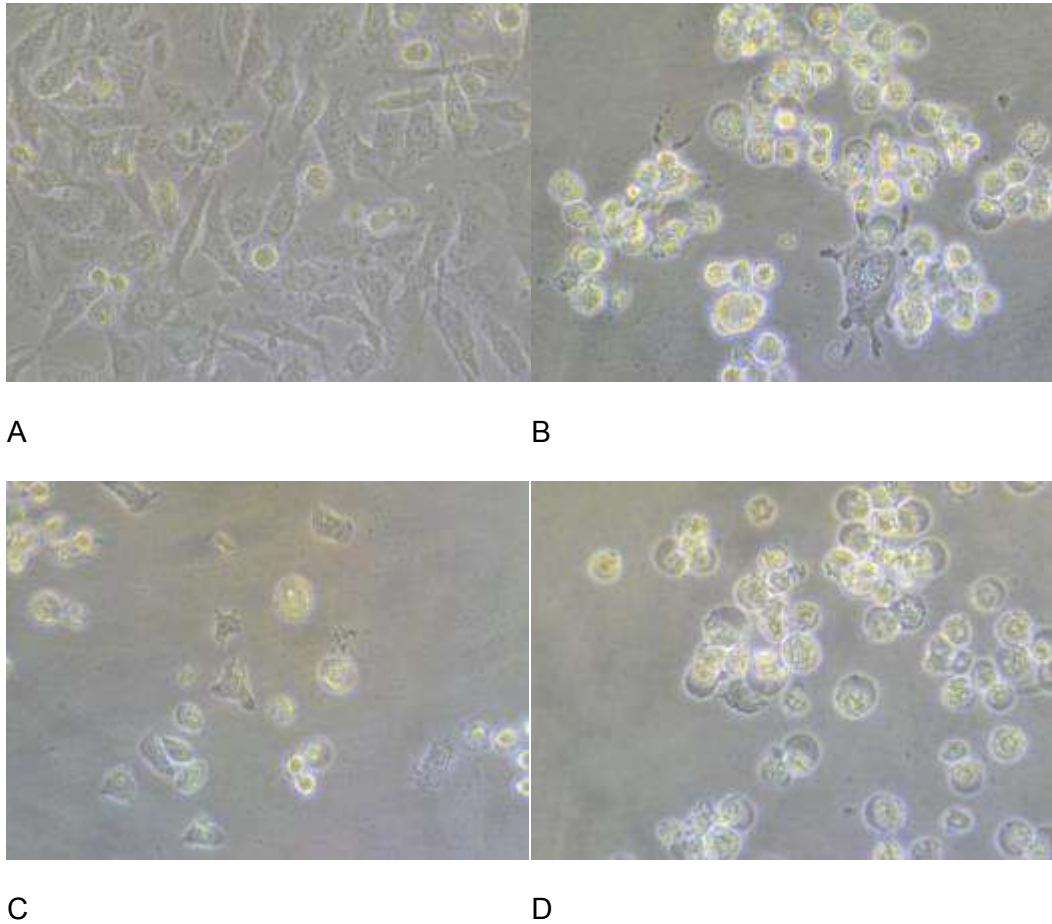


FIGURA 5.21: Cambios en la morfología de las células PC-3 a las 48 h de tratamiento. Fotos 40X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Células con medio de cultivo (Testigo). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1 μ M (Q). D) Células tratadas con QBS 1 μ M y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

En la Figura 5.21 A se puede observar un crecimiento normal de las células PC-3 y su morfología característica, mientras que en la 5.21 B se observan que el aceite estercúlico provocó que un gran número de células que perdieran adherencia y que algunas células adheridas mostraran vesiculaciones en la membrana. El tratamiento con QBS (Figura 5.21C) provocó el desprendimiento de la mayoría de las células a la placa de cultivo y en la Figura se aprecia una morfología completamente distinta al de las células testigo. El efecto combinado de QBS y aceite estercúlico dejó a las células desprendidas de la placa de cultivo casi en su totalidad (5.21D).

La proporción de células en apoptosis fue analizada por citometría de flujo, y los resultados se muestran en la Figura 5.22.

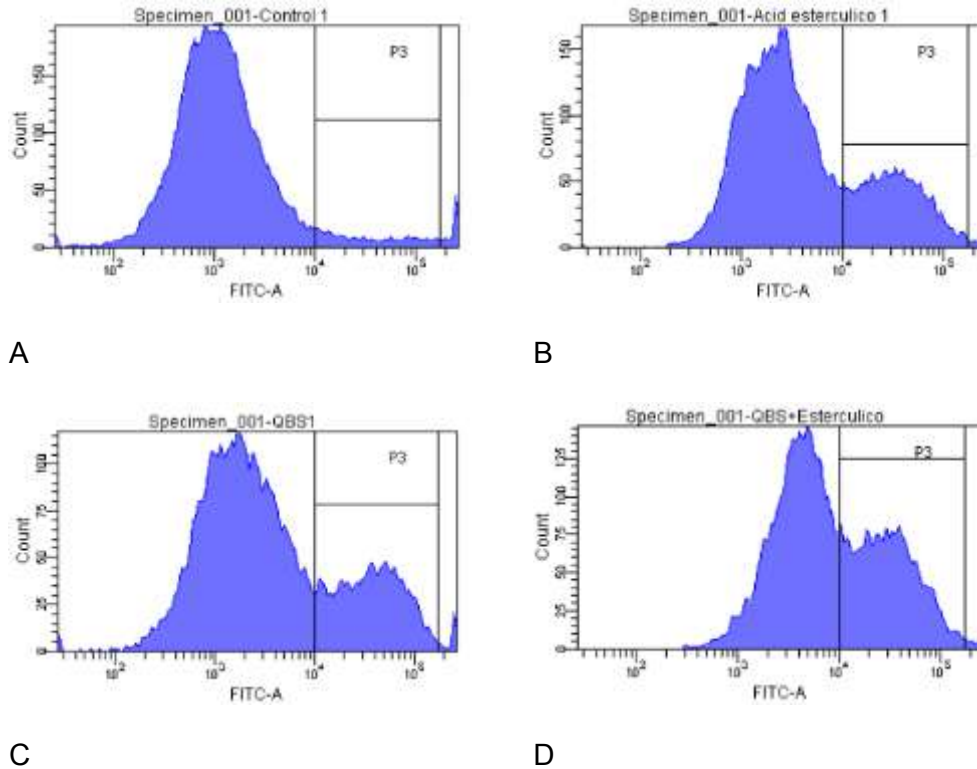


Figura 5.22: Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células PC-3 a las 48 h de tratamiento. La región P3 indica apoptosis. A) Células con medio de cultivo (Testigo). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1µM (Q). D) Células tratadas con QBS 1µM y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

En la Figura 5.22 A se puede observar el nivel de apoptosis de las células PC-3 cultivadas en condiciones normales. Cuando las células se trataron con aceite estercúlico 4 mM, se observó un efecto apoptótico, ya sea actuando solo (Figura 5.22 B) o en combinación con QBS (Figura 5.22 D). El tratamiento positivo con QBS mostró un efecto apoptótico como se esperaba (Figura 5.22 C). Es interesante mencionar que, tanto en los histogramas como en las fotografías al microscopio, se puede observar que el efecto pro-apoptótico fue similar con QBS y con aceite

estercúlico. Está reportado que la inhibición de la actividad de SCD induce apoptosis por sus diversos efectos en la acumulación de ácidos grasos saturados, la desregulación de ACC y su rol en las vías AMPK (Scaglia *et al.*, 2009), por otro lado se sabe que el aceite estercúlico ha funcionado como inhibidor de SCD en modelos *in vivo* (Ortinou *et al.*, 2013; Herrera-Meza *et al.*, 2014) e *in vitro* (Gómez *et al.*, 2003). En conjunto, esta información permite afirmar que el efecto apoptótico observado en los tratamientos con aceite estercúlico está relacionado con la inhibición de SCD y la alteración consecuente del perfil lipídico. La cuantificación de los histogramas y el análisis estadístico representado en la Figura 5.23 son congruentes con esta última afirmación.

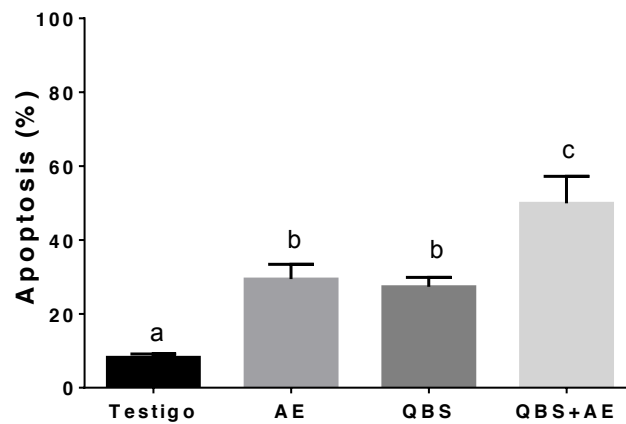


FIGURA 5.23: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células PC-3 con distintos tratamientos a 48 de tratamiento. Testigo: Células con medio de cultivo. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. QBS: Células con medio de cultivo y QBS 1µM. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y QBS 1µM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se transloca a la cara externa de la membrana celular, esta característica es aprovechada en este ensayo para que se una a anexina y se pueda teñir la célula, sin embargo, a largo plazo, la membrana pierde su integridad y entra el IP para teñir a las células (Fadok *et al.*, 1992; Cascales

et al., 2003; Simon, 2013). En el primer caso hablamos de una apoptosis temprana y en el segundo de una apoptosis tardía, en este ensayo se consideró indistintamente cualquiera de las dos.

En la Figura 5.23 se puede ver el nivel de apoptosis normal en el tratamiento testigo ($8.23\% \pm 0.9$), y que el aceite estercúlico provocó un incremento en este nivel ($29.43\% \pm 3.96$), de forma similar al QBS ($27.33\% \pm 2.54$). Es interesante señalar que, al actuar en combinación, se logró un nivel significativamente mayor de células en apoptosis ($49.93\% \pm 7.31$). Aunque todos los tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con el testigo, no hubo diferencias entre el aceite estercúlico y el QBS, lo que se refuerza al observar la similitud de sus histogramas y fotografías al microscopio. Se debe tomar en cuenta que un metabolismo alterado de ácidos grasos en la célula puede tener efecto en las vías de señalización de los procesos apoptóticos aumentando la liberación del citocromo c, la expresión de caspasas pro-apoptóticas e inhibidoras de cdk's, inactivación de Bcl-2, incremento de Fas y de caspasa 8 (las dos últimas relacionadas con las vías extrínsecas mientras que las primeras se relacionan con las vías intrínsecas de la apoptosis) (Zamora *et al.*, 2005). Se ha reportado precisamente que la presencia de SCD modifica los perfiles lipídicos *in vivo* e *in vitro* (Falvella *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Ortinau *et al.*, 2013; Herrera-Meza *et al.*, 2014), por lo anterior, no queda duda de que la apoptosis fue el resultado de haber modificado el perfil lipídico de las células al suministrar el aceite estercúlico.

5.4.2 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular LnCaP

LnCap modela una etapa temprana del cáncer de próstata mientras que PC-3 representa un periodo metastásico, por esta razón se hizo necesario evaluar también el efecto apoptótico en LnCaP, utilizando los mismos tratamientos. El análisis de la morfología celular se muestra en la Figura 5.24.

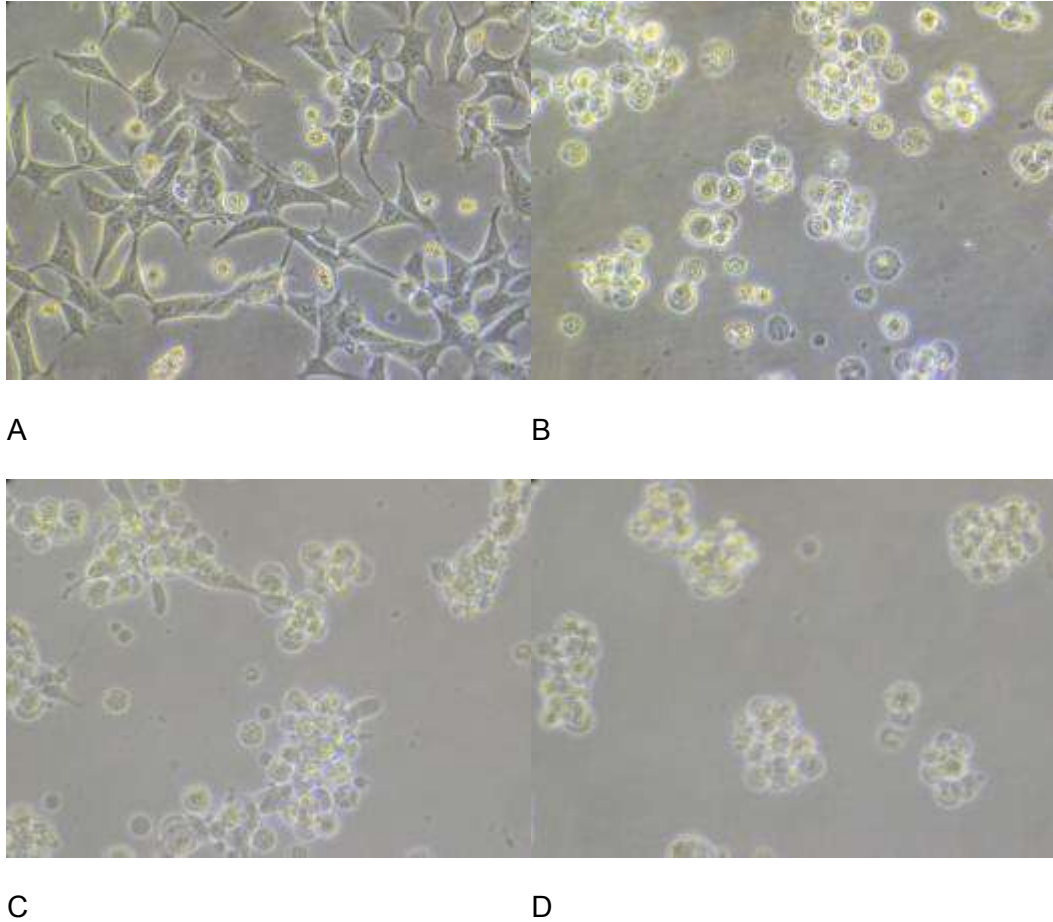


Figura 5.24: Cambios en la morfología de las células LnCaP a las 48 h de tratamiento. Fotos 40X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Células con medio de cultivo (Testigo). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1µM (Q). D) Células tratadas con QBS 1µM y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

En la Figura 5.24 A se puede observar el crecimiento normal de las células LnCaP, con la morfología característica y el espacio intercelular normal. Al tratarlas con aceite estercúlico (5.24 B), se observa un gran número de células que perdieron adherencia y sin la forma característica. El tratamiento con QBS (Figura 5.24 C) provocó el desprendimiento de la mayoría de las células a la placa de cultivo y, de las células aún adheridas, se observa una morfología completamente distinta al de las células testigo, lo que indica el inicio de un proceso apoptótico. El efecto

combinado de QBS y aceite estercúlico (5.24 D) dejó a las células desprendidas de la superficie de cultivo casi en su totalidad. El efecto apoptótico fue analizado por citometría de flujo, y se muestra en la Figura 5.25.

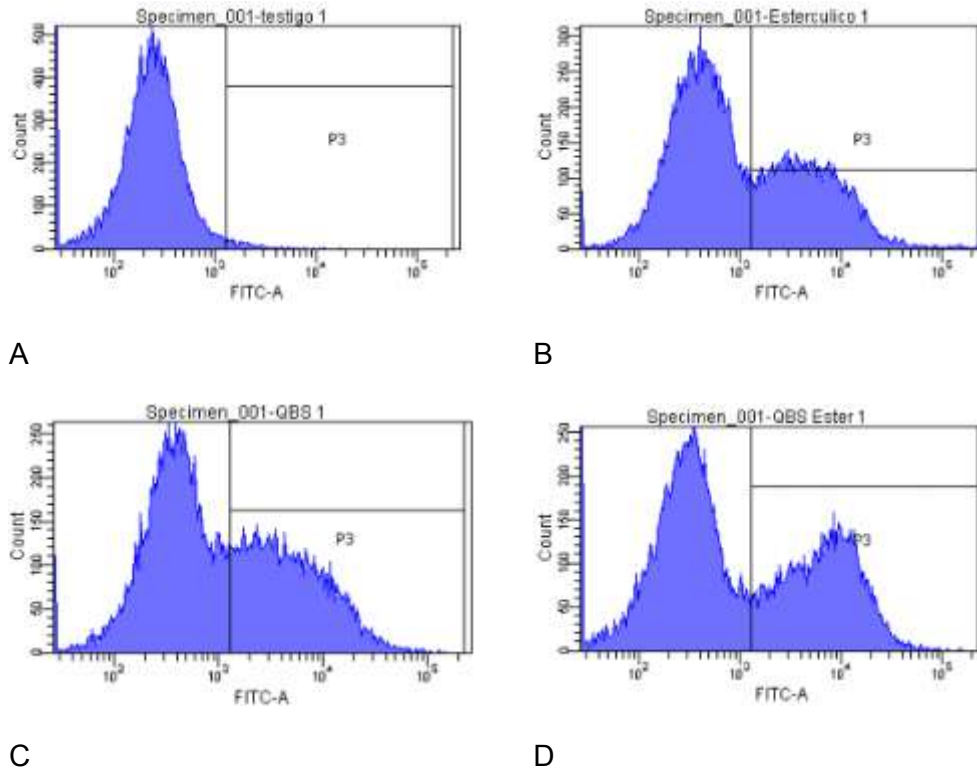


Figura 5.25: Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células LnCaP a las 48 h de tratamiento. La región P3 indica apoptosis. A) Células con medio de cultivo (Control). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1μM (Q). D) Células tratadas con QBS 1μM y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

Como puede observarse, en las células testigo (Figura 5.25 A) hubo un nivel de apoptosis bajo; en cambio, en las células tratadas con el aceite estercúlico se observó una mayor proporción de células apoptóticas, tanto al actuar solo (Figura 5.25 B) como en combinación con QBS (Figura 5.25 D). El tratamiento positivo con QBS demostró un efecto apoptótico, como se esperaba (Figura 5.25C). Se debe señalar que, tanto en los histogramas como en las fotografías al microscopio, la

apoptosis inducida fue similar con QBS y con aceite estercúlico. La cuantificación de los histogramas y el análisis estadístico representado en la Figura 5.26 confirman lo anterior.

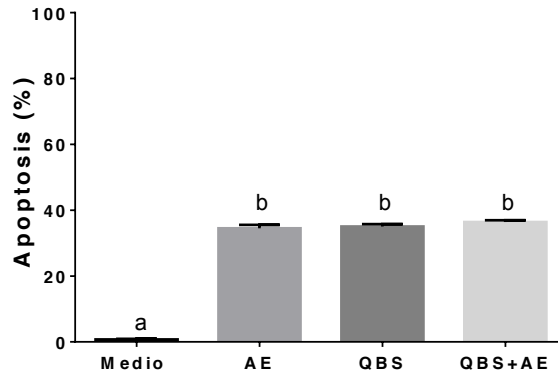


FIGURA 5.26: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células LnCaP a las 48 h de tratamiento. Testigo: Células con medio de cultivo. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. QBS: Células tratadas con QBS 1 μ M. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y QBS 1 μ M. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como puede observarse en la Figura 5.26, el nivel de apoptosis en las células de un cultivo sin tratamiento, que se considera normal, es del $0.73\% \pm 0.2$. En cambio, el tratamiento con el aceite estercúlico provocó un incremento en la proporción de células en apoptosis, llegando al $34.5\% \pm 1.03$, de forma similar al QBS, con el que el nivel de apoptosis llegó al $35.03\% \pm 0.76$. En el tratamiento combinado de aceite estercúlico y QBS se observó el mismo nivel de apoptosis $36.4\% \pm 0.55$ que cuando actuaron por separado. Aunque todos los tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con el testigo, no hubo diferencias entre los niveles alcanzados con aceite estercúlico, QBS y la combinación de ambos. Los porcentajes de apoptosis que se obtuvieron con los tres tratamientos son consistentes con las poblaciones celulares arrestadas en G2 en los ensayos de ciclo celular y los porcentajes de viabilidad para esta línea celular, esto apunta a la idea del uso potencial del aceite estercúlico en el tratamiento del cáncer de próstata como coadyuvante.

5.4.3 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre la línea celular RWPE1

Se evaluó también el efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre una línea celular de próstata sana y se eligió el modelo RWPE1 de epitelio. En la Figura 5.27 se muestra la morfología de las células de RWPE1 después de los tratamientos con aceite estercúlico y QBS.

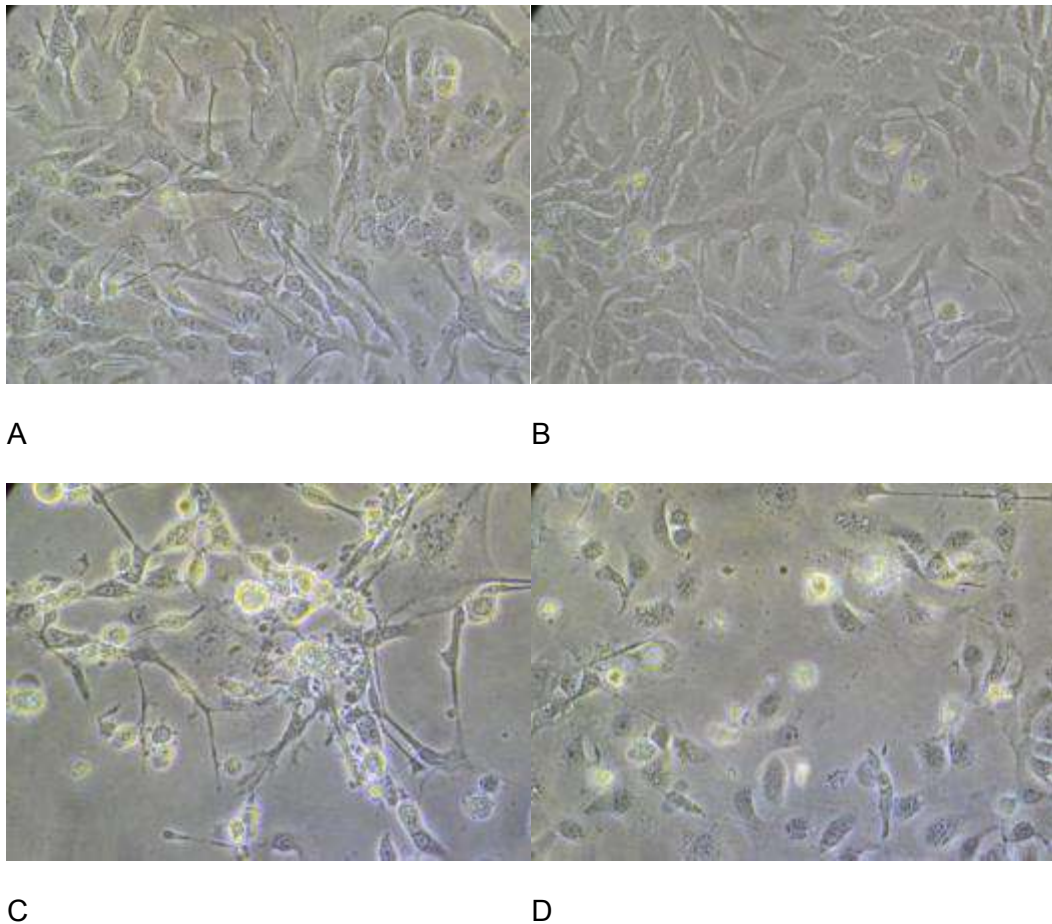


Figura 5.27: Cambios en la morfología de las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento. Fotos 40X en microscopio invertido DMi1 de Leica Microsystem. A) Células con medio de cultivo (Control). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1µM (Q). D) Células tratadas con QBS 1µM y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 5.27 A se observa el crecimiento normal de las células RWPE-1, con la morfología característica y un espacio intercelular normal; en la Figura 5.27 B se observa que el aceite estercúlico provocó una ligera disminución del crecimiento, pero conservando la morfología de las células sanas. El tratamiento con QBS (Figura 5.27 C) provocó el desprendimiento de una gran cantidad de células de la placa de cultivo y, de las células aún adheridas, se observa una morfología distinta a la de las células testigo, lo que indica el inicio de un proceso apoptótico, tal como se esperaba con este testigo positivo. El efecto combinado de QBS y aceite estercúlico (5.27D) provocó el desprendimiento de un pequeño porcentaje de células, sin embargo, la mayoría se encontraron adheridas a la placa y con la morfología característica de las células sanas. El efecto apoptótico fue analizado por citometría de flujo, y se muestra en la Figura 5.28.

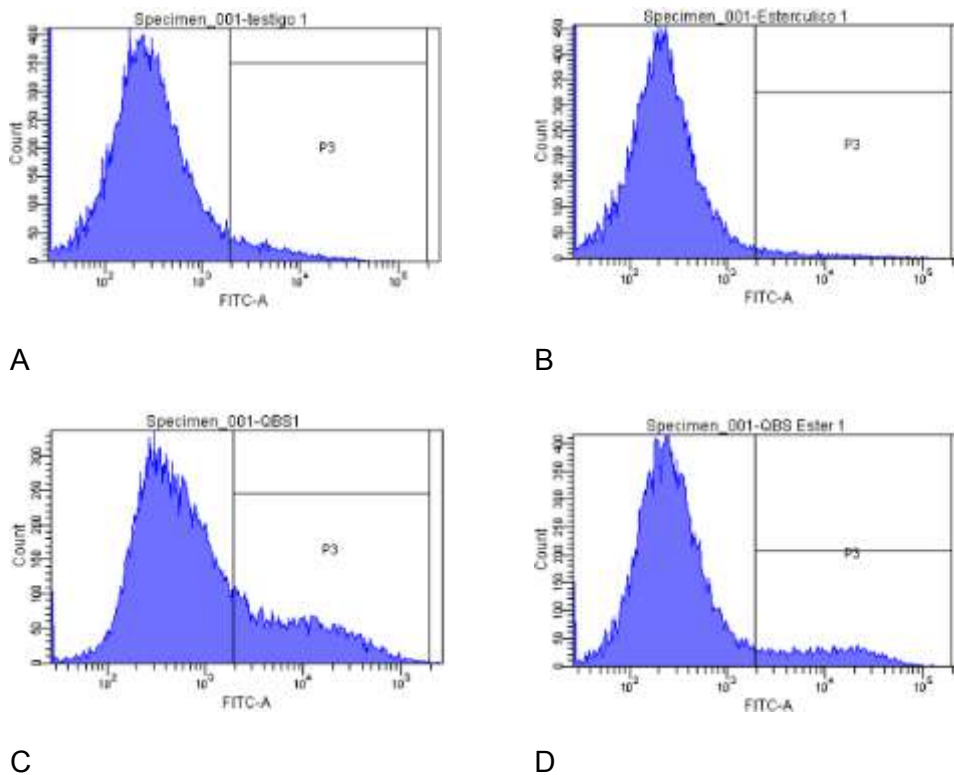


Figura 5.28 Efecto apoptótico del aceite estercúlico sobre las células RWPE1 a las 48 h de tratamiento. La región P3 indica apoptosis. A) Células con medio de cultivo (Testigo). B) Células tratadas con ácido estercúlico 4mM (AE). C) Células tratadas con QBS 1 μ M (Q). D) Células tratadas con QBS 1 μ M y ácido estercúlico 4mM (Q+AE).

Como se muestra en la Figura 5.28, hubo un nivel de apoptosis bajo en las células RWPE1 testigo (Figura 5.28A), que no se vio modificado por el tratamiento con el aceite estercúlico (Figura 5.28 B). Como lo esperado, el QBS provocó que un mayor número de células estuvieran en apoptosis (Figura 5.28 C). Sin embargo, cuando se combinó el QBS con el aceite estercúlico (Figura 5.28 D), se revirtió el efecto apoptótico del QBS. La cuantificación de los histogramas y el análisis estadístico representado en la Figura 5.29 confirman lo anterior.

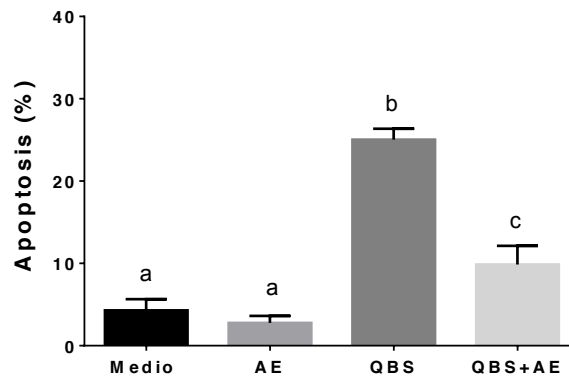


FIGURA 5.29: Efecto apoptótico del aceite estercúlico en células RWPE-1 con distintos tratamientos durante 48 h. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. QBS: Células con medio de cultivo y QBS 1µM. N+AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM y QBS 1µM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 5.29 se observa que hubo un porcentaje de células en apoptosis del 4.3% (± 1.35) en las células testigo, y que este porcentaje no fue significativamente diferente al tratarlas con el ácido estercúlico 4mM, donde el 2.76% (± 0.85) de células fueron apoptóticas. Cuando fueron tratadas con QBS, el 25.03% (± 1.33) de las células entraron en apoptosis; sin embargo, cuando se combinó con el aceite estercúlico, únicamente un 9.86% (± 2.26) fueron apoptóticas, lo que sugiere un efecto protector del aceite estercúlico sobre el efecto pro-apoptótico del QBS. Se ha reportado que el bloqueo de SCD con CVT-11127 disminuye la proliferación e induce apoptosis de células cancerosas H460 pero no de fibroblastos humanos sanos (Hess *et al.*, 2010). En esta investigación, al aplicar aceite estercúlico, la viabilidad celular

de PC-3 y Ln-CaP se disminuyó pero no se afectó la viabilidad de RWPE1, posteriormente se comprobó observando un incremento en los niveles de apoptosis en células cancerosas (PC-3 y LnCaP) y ningún efecto apoptótico sobre células sanas (RWPE1).

5.5 Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión del gen de Estearoil CoA Desaturasa en las células PC-3, LnCaP y RWPE1

Después de comprobar que había un efecto en la proliferación de células PC-3 y LnCaP, se midió la expresión del gen de SCD en estas líneas celulares y en la de epitelio de próstata sano (RWPE1), debido a la importante participación de esta enzima en el metabolismo lipídico y en la proliferación celular. Se midió la expresión mediante la cuantificación por PCR en tiempo real (Q-PCR).

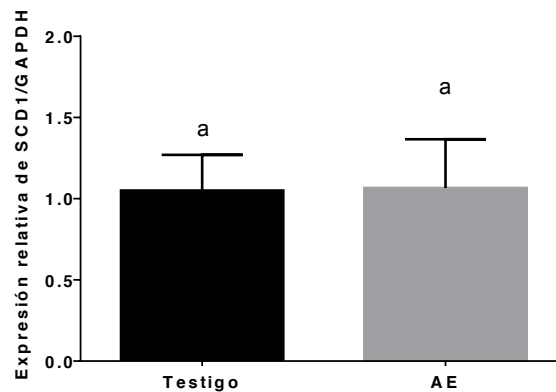


FIGURA 5.30: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células PC-3 a 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se aprecia en la Figura 5.30 que la expresión del gen de SCD no se modificó al aplicar el ácido estercúlico 4mM a células PC-3, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el testigo y el tratamiento con aceite estercúlico. La expresión relativa de SCD respecto al gen endógeno (GAPDH) fue de 1.03 ± 0.29 , considerando la expresión en el testigo como 1. Por otro lado, en la Figura 5.31 se

puede ver que tampoco hubo diferencias significativas en la expresión del mismo gen en células LnCap en relación al testigo; la expresión relativa de SCD fue 0.95 ± 0.18 .

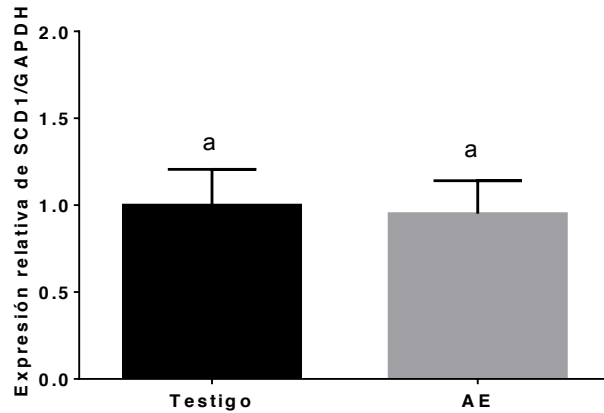


FIGURA 5.31: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células LnCaP a 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el caso de células sanas RWPE1, sí hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo. La expresión de SCD fue de $0.60 (\pm 0.17)$ en relación al testigo (Figura 5.32).

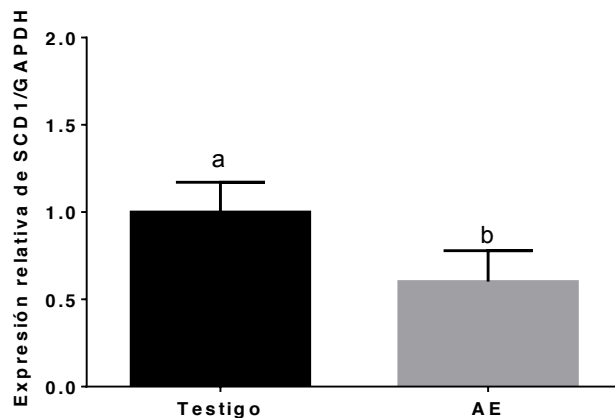


FIGURA 5.32: Efecto del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD en células RWPE1 a 48 h de tratamiento. Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

La expresión de SCD no cambió al aplicar el tratamiento con aceite estercúlico, esto coincide con el hecho de que, al inhibir la actividad de SCD con ácido estercúlico en adipocitos no diferenciados, se observó que la expresión del mRNA de SCD no se modificó y tampoco se modificaron los niveles de proteína además de que se registró una disminución de la actividad enzimática a través de las alteraciones en el perfil lipídico de las células (Gómez *et al.*, 2003). Por otro lado, si se observaron cambios en la expresión de SCD al trabajar con células sanas, esto coincide con el hecho de que la viabilidad celular no se ve alterada tan drásticamente en RWPE1 como en las líneas cancerosas. Nuevamente, el comportamiento de las células sanas con el aceite estercúlico es distinto al que presentan las células cancerosas. Cabe mencionar que, el estercúlico no modifica la expresión de SCD pero si lo puede hacer la acumulación de ácidos grasos saturados al generar estrés en el retículo endoplásmico y reducir simultáneamente la expresión de ACC.

5.6 Efecto del aceite estercúlico sobre los niveles de enzima Estearoil CoA Desaturasa en PC-3, LnCaP y RWPE1.

Después de observar que no había efecto sobre la expresión de SCD en PC-3 y en LnCaP, se midieron los niveles de enzima para ver si el efecto estaba a nivel de post-transcripcional. Los niveles de enzima SCD se mostraron sin cambios en las tres líneas celulares al ser tratadas con ácido estercúlico 4mM. En células PC-3 (Figura 5.33A), se tuvo un nivel de proteína de 0.81 (± 0.15) en las células tratadas con el aceite estercúlico, mientras en el testigo fue de 0.87 (± 0.15). En las células LnCap (Figura 5.33B) el nivel de proteína fue de 1.04 (± 0.13) al ser tratadas con estercúlico al tiempo que las células testigo se ubicaron en 0.96 (± 0.15). En las células RWPE1 (Figura 5.33C), las células testigo estuvieron en 0.83 (± 0.12), los tratamientos se ubicaron en 0.81 (± 0.15). En ninguna de las tres líneas celulares hubo diferencias significativas entre el testigo y el tratamiento con aceite estercúlico.

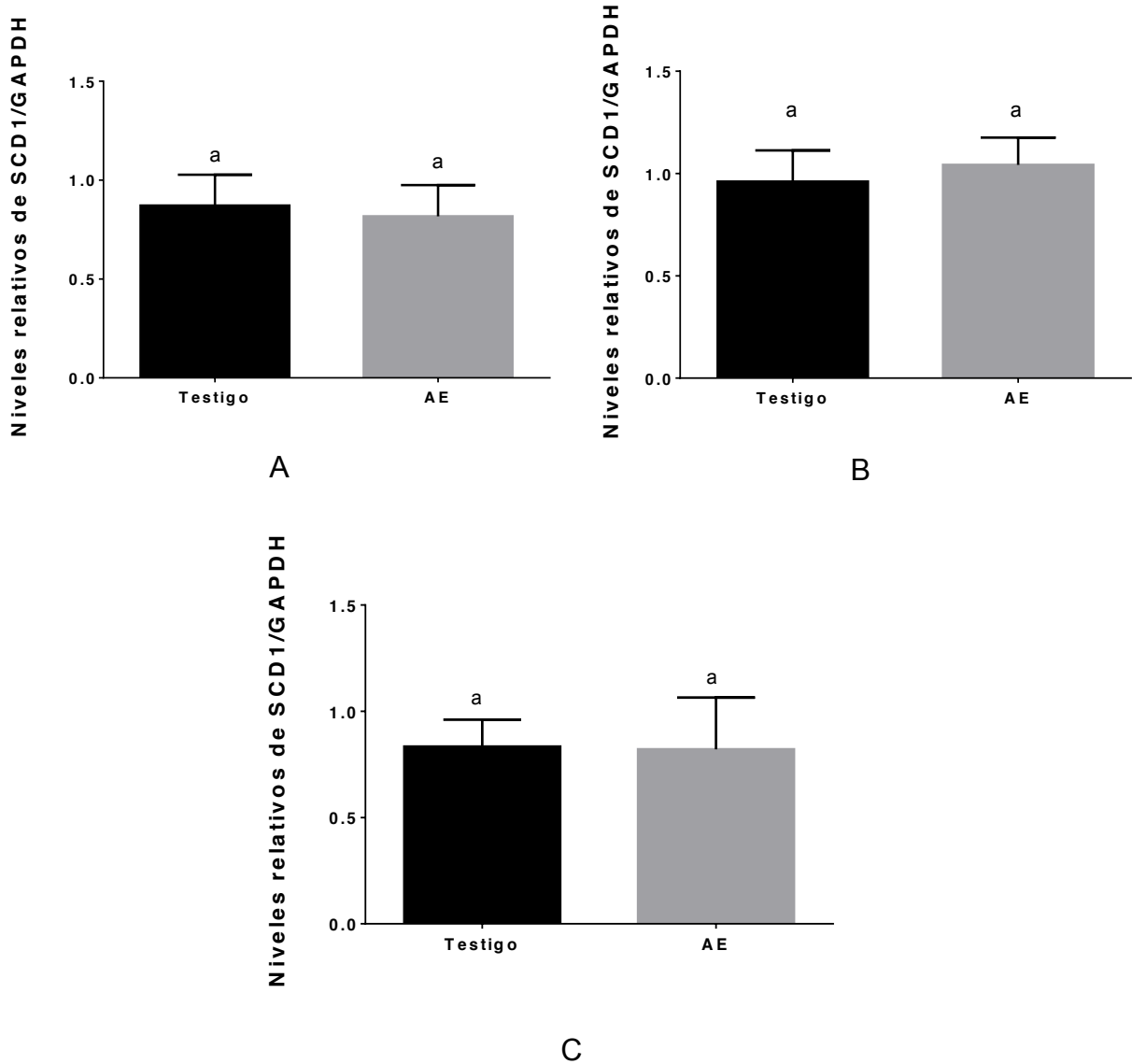


FIGURA 5.33: Cuantificación de enzima SCD en relación a GAPDH en células PC3 (A), LnCap (B) y RWPE1 (C). Testigo: células sin tratamiento. AE: Células tratadas con ácido estercúlico 4mM. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Estos resultados son congruentes con lo esperado, ya que se ha reportado que el estercúlico inhibe la actividad de la enzima SCD, pero no la expresión de su gen (Gómez *et al.*, 2003).

5.7 Efecto del aceite estercúlico sobre la actividad de Esteroil CoA Desaturasa en PC-3, LnCaP y RWPE1.

Se evaluó también el efecto del aceite estercúlico sobre la actividad enzimática de la SCD. Un parámetro utilizado para medir la actividad de SCD es el índice de desaturación calculado como el cociente C16:1/C16:0 y C18:1/C18:0 (Loza-Medrano, Baiza-Gutman, & Ibáñez-Hernández, 2018). Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.

TABLA 5.2: Índices de desaturación en células PC3, LnCaP y RWPE1 después del tratamiento con aceite estercúlico (AE), aceite de soya (As) y aceite de maíz (AM).

Línea	Índice de desaturación	Testigo		AE	As	AM
PC-3	C16:1/C16:0	0.07	↓85% →	0.01	0.06	0.05
	C18:1/C18:0	10.12	↓48% →	5.29	13.72	16.28
LnCaP	C16:1/C16:0	0.064	↓69% →	0.02	0.064	0.065
	C18:1/C18:0	11.55	↓42% →	6.64	10.97	16.73
RWPE1	C16:1/C16:0	0.06	↓50% →	0.03	0.057	0.05
	C18:1/C18:0	11.66	↓28% →	8.40	10.78	15.85

En la Tabla 5.2 se puede ver que, para todas las líneas celulares, los índices de desaturación fueron menores en las células tratadas con aceite estercúlico, en comparación con las células testigo y las tratadas con aceite de soya o de maíz. El índice de desaturación para células PC3 tratadas con aceite estercúlico (AE) fue 85% (16:1/16:0) y 48% (18:1/18:0) menor que el de las células testigo. Para las células LnCap, los índices fueron 69% (16:1/16:0) y 42% (18:1/18:0) menores que las

testigo. Similar comportamiento se observó en las células sanas RWPE1, donde los índices de desaturación fueron 50% (16:1/16:0) y 28% (18:1/18:0) menores en comparación con las testigo. Esto confirmó que el efecto del aceite estercúlico sobre a SCD en células PC3, LnCaP y RWPE1 se da a nivel de la inhibición de su actividad, sin alterar los niveles de expresión y de enzima SCD. Al disminuir la actividad de SCD, se altera la composición lipídica y se disminuye la disponibilidad de lípidos de membrana modificando su fluidez y alterando el ciclo celular (Igal, 2016).

No se han reportado estudios *in vitro* que utilicen aceite o ácido estercúlico sobre células cancerosas como inhibidor de SCD, solo se han realizado este tipo de estudios con inhibidores químicos. Los resultados obtenidos en esta investigación se pueden comparar con los de algunos investigadores (Tabla 5.3), como los de Ortinou *et al.* (2013) que trabajaron con hepatocitos de ratas OLEFT inhibiendo SCD con aceite estercúlico y bajaron la actividad desaturasa entre un 23% y 50%, o los de Fritz *et al.* (2010) que inhibieron SCD en prostatocitos de ratón con el compuesto BZ36 para ver su efecto en la señalización oncogénica y encontraron una disminución de la actividad desaturasa entre el 27% y 33%. Herrera-Meza *et al.* (2013) pudieron observar una disminución de la actividad desaturasa de entre el 50% y 80 % en hepatocitos de ratas Wistar suministrando aceite estercúlico como fuente de lípidos en la dieta, mientras que Rodríguez-Cuenca (2006) reporta una disminución entre el 50% y 72% utilizando RNAi en un modelo *in vitro* con adipocitos.

TABLA 5.3: Reporte de inhibición de actividad de SCD con distintos métodos.

Referencia	Índice	Inhibidor	%	Tipo de células	Modelo
Ortinou <i>et al.</i> , (2013)	16:1/16:0	Aceite estercúlico	↓50%	Hígado	<i>In vivo</i>
	18:1/18:0		↓23%		
Herrera-Meza <i>et al.</i> , (2013)	16:1/16:0	Aceite estercúlico	↓80%	Hígado	<i>In vivo</i>
	18:1/18:0		↓50%		
Rodríguez-Cuenca <i>et al.</i> , (2006)	16:1/16:0	RNAi	↓72%	Adipocitos	<i>In vitro</i>
	18:1/18:0		↓50%		
Fritz <i>et al.</i> , (2010)	16:1/16:0	BZ36	↓33%	Próstata	<i>In vivo</i>
	18:1/18:0		↓27%		

Se sabe que al modificar la actividad desaturasa cambia el perfil lipídico y se ve disminuida la proliferación celular (Igal, 2016), en esta investigación se pudo apreciar este efecto con la particularidad de que fue hasta cinco veces mayor en células cancerosas que en las sanas. El aceite estercúlico pudo reducir la viabilidad celular a los mismo niveles que algunos fármacos utilizados en terapias de cáncer, tales como QBS y Nocodazol (Gilmores *et al.*, 2018), arrestó el ciclo celular en G2 del mismo modo que el nocodazol e indujo apoptosis a los mismos niveles que el QBS, bajó la actividad desaturasa de SCD de igual forma que otros inhibidores químicos como el CVT11127 o BZ36, incluso sin afectar la expresión y los niveles de enzima SCD para el caso de células cancerosas y sanas como lo hacen los ensayos de silenciamiento génico. Todo esto permite visualizar el potencial del aceite estercúlico como coadyuvante en el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de próstata.

CONCLUSIONES

El aceite estercúlico es un inhibidor potencial de la proliferación de células de cáncer de próstata (LnCaP y PC3), de mama (MCF7) y cérvicouterino (HeLa). Además, para el caso de cáncer de próstata se demostró que, al igual que otros fármacos utilizados actualmente, el aceite estercúlico puede arrestar el ciclo celular, inducir apoptosis y disminuir la proliferación celular con la ventaja de ser una fuente natural de lípidos.

Al encontrar una IC_{50} alta de ácido estercúlico para las células PC3 en comparación con las de los fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer, quedó demostrada su baja toxicidad para células sanas. Lo anterior se confirma con el hecho de que el efecto citotóxico del aceite estercúlico evaluado en células sanas de próstata (RWPE1 y PrSC) se mantuvo al mismo nivel que el efecto provocado por los aceites de maíz y de soya en las mismas líneas celulares.

El aceite estercúlico mostró potencial como inhibidor de Esteroil CoA Desaturasa al reducir parcialmente su actividad en modelos celulares de cáncer de próstata inicial (LnCaP) y metastásico (PC3), y en un modelo de epitelio de próstata sano (RWPE1), lo que se relaciona con el efecto antiproliferativo y pro-apoptótico observado en las líneas celulares cancerosas.

No hubo efecto significativo del aceite estercúlico sobre la expresión de SCD ni sobre sus niveles, únicamente se encontró efecto a nivel de actividad enzimática.

RECOMENDACIONES

Estudiar el efecto de ácido estercúlico puro sobre células sanas y cancerosas de próstata, de mama y cérvicouterino.

Profundizar en el mecanismo de acción y la influencia del aceite estercúlico en la regulación del ciclo celular y apoptosis mediante ensayos de expresión diferencial.

Estudiar el efecto coordinado del aceite estercúlico sobre las enzimas que catalizan puntos de control en el metabolismo lipídico y sobre los puntos de control del ciclo celular.

BIBLIOGRAFÍA

Ashida, S., Kawada, C., & Inoue, K. 2017. Stromal regulation of prostate cancer cell growth by mevalonate pathway enzymes HMGCS1 and HMGCR. *Oncol Lett.* 14 (6): 6533-6542.

Beckers, S., Organe, L., Timmermans, K., Scheys, A., Peeters, K., & Brusselmans, G. 2007. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res.* 67 (17): 8180-8187.

Bello, D., Webbe, M., Kleinman, H., Waringer, D., & Rhim, J. 1997. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis.* 18 (6): 1215-1223.

Berliner, J., Navab, M., Fogelman, A., Demer, L., Edwards, P., Watson, A., y otros. 1995. Atherosclerosis: Basics Mechanisms, Oxidatio, Inflammatio and Genetics. *Nature, Int J Prev Med.* 125(2): 2488-2493.

Blajeski, A., Phan, V., Kottke, T., & Kaufmann, S. 2002. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cell. *J Clin Invest.* 110 (1): 91-99.

Cascales, M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *An R A Farm.* 69(1):, 36-64.

Chopra, R., Nayer, s., and Chopra, I. 1992. Glosary of Indian Mecinal Plants. *C Scie I Res.* 192(3): 7-246.

Corl, B., Baumgard, L., Dwyer, D., Griinari, J., & Phillips, B. B. 2001. The role of D-9 desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *Nut Chem J.* 145 (9) : 622-630.

Cornell, R. B., & Horwitz, A. F. 1980. 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 Cel Biol.* 86: 810-819.

Dalvai, M., & Bystrick, K. 2010. Cell Cycle and Anti-Estrogen Effects synergize to Regulate Cell Proliferation and ER Target Gene Expression. *PloS One.* 5(6): 1-9.

- Demoulin, J., Ericsson, J., Kallin, A., Rorsman, C., Ronnstrand, L. and Heldin, C. 2004. Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 279(34): 35393-35402.
- Diniz, Z. N., Bora, P. S., Neto, V. Q., and Cavalheiro, J. M. 2008. *P. Sterculia striata* seed kernel oil: characterization and thermal stability. *Int J Food Sci Technol.* 113(1): 160-165.
- Dobrzyn, P., Jazurek, M., & Dobrzyn, A. 2010. Stearoyl-CoA desaturase and insulin signaling- What is the molecular switch? *BBA-Bio.* 134(4): 1189-1194.
- Duplus, E., Glorian, M., Forest, C. 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 274(5): 49-52.
- Enoch, H., Catala, A., and Strittmatter, P. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase: studies of substrate specificity, enzyme-substrate interactions and the function of lipid. *J Biol Chem.* 251(6): 5095-5103.
- Fadok, V., Savill, J., Haslett, C., Bratton, D., Doherty, D. and Campbell, P. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Cell Biol.* 119 (1): 4029-4035.
- Falvella, F., Pascale, R., Gariboldi, M., Manenti, G., De Miglio, M., Simile, M. 2002. Stearoyl-CoA desaturase 1 (*scd1*) gene overexpression is associated with genetic predisposition to hepatocarcinogenesis in mice and rats. *Carcinogenesis.* 23(11): 1933-1936.
- Ferlay, J., Serjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S. and Mathers, C. 2016. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *IARC Cancer Base.* 10(11): 216-221.
- Fermor, B., Masters, J., Wood, C., Miller, J., Apostolov, K., & Habib, N. 1992. Fatty Acid Composition of Normal and Malignant Cells and Cytotoxicity of stearic, Oleic and sterculic Acid in vitro. *Eur J Cancer.* 16(2):1142-1147.
- Fernández-Serra, A., Rubio-Briones, J., García-Casados, Z., Solsona, E., and López Guerrero, J. 2010. Cáncer de próstata: La revolución de los genes de fusión. *Actas Urol Esp.* 35(7): 420-428.
- Friedman, J. M. 2003. A war on obesity, not the obese. *American Association for the Advancement of Science.* 115(7): 856-858.
- Fritz, V., Benfodda, Z., Rodier, G., Henriquet, G. and Iborra, F. 2010. Abrogation of De novo Lipogenesis by stearoyl-CoA Desaturase 1 Inhibition Interferes with Oncogenic signaling and Blocks Prostate Cancer Progression in Mice. *Mol Cancer Ther.* 9(6):1740-1754.

- García-Álvarez, I., y Otero, J. 2010. Efectos no antimicrobianos de la tetraciclinas. *Rev Esp Quimioter.* 23(1):4-11.
- Gilmore, S., Gonye, A., Li, E., Espinosa de Los Reyes, S., Gupton, J., and Quintero, O. 2018. Effects of a novel microtubule-depolymerizer on pro-inflammatory signaling in RAW264.7 macrophages. *Chem Biol Interact*, 11(5): 109-116.
- Gleeson, R., Ayub, M., and Wright, E. A. 1990. Fatty acid control of growth of human cervical and endometrial cancer cells. *Br J Cancer.* 157(3): 500-503.
- Golfman, L., Backovic, M., and Vance, D. 2001. Transcription of the CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha gene is enhanced during the s phase of the cell cycle. *J Biol Chem.* 276(47): 43688-43692.
- Gomez, F. E., Bauman, D. E., Ntambi, J. M., and Fox, B. G. 2003. Effects of sterculic acid on stearoyl-CoA desaturase in differentiating 3t3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(5): 316-326.
- Gupta, R., Kazmi, I., Afzal, M., Khan, R., Chauhan, M. and Al-Abbasi, F. 2013. Combination of sulfamethoxazole and selenium in anticancer therapy: a novel approach. *Mol Cel Biochem.* 384(1): 279-285.
- Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J., Lees, E., & Reed, S. 1994. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad*, 91(1):123-129.
- Herrera-Meza, S., Martínez, A., Sánchez-Otero, M., Mendoza-López, M., García-Barradas, O., Ortiz-Viveros, G., and Oliart-Ros, R.M. 2014. Fatty acid composition and some physicochemical characteristics of stercuria apetala seed oils. *Int J Fats and Oils*, 145(5): 65-67.
- Hess, D., Chisholm, J. W., and Igal, R. A. 2010. Inhibition of stearoylCoA Desaturase Activity Blocks Cell Cycle Progression and Induces Programmed Cell Death in Lung Cancer Cells. *PLoS One.* 5(6): 11394-11402.
- Igal, R. 2016. Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism. *BBA-Bio.* 143(3):18865-1880.
- Jackowski, S. 1994. Coordination of Membrane Phospholipid synthesis with the Cell Cycle. *J. Biol. Chem.* 296(5): 3858-3867.
- Khoo, D., Fermor, B., Miller, J., Wood, C., Apostolov, K. and Barker, W. 1991. Manipulation of body fat composition with sterculic acid can inhibit mammary carcinomas in vivo. *Mac Press Ltd.* 63(1): 97-101.
- Lee, J. C., Field, D. J. and Lee, L. L. 1980. Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochem.* 17(4): 6209-62015.

- Lee, S. B., Park, Y. I. and Dong, M. S. 2010. Identification of 2,3,6-tri-substituted quinoxaline derivatives as a Wnt2/b-catenin pathway inhibitor in non-small lung cancer cell lines. *Bioorganic Med Chem Let*, 20(1): 5900-5904.
- Li, J., Yu, X., Pan, W. and Unger, R. 2002. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *J Physiol Endocrinol Metab*. 282(6): 1334-41.
- Lingwood, D., and Simons, K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 327(1): 46-50.
- Loza-Medrano, S. S., Baiza-Gutman, L. A. and Ibáñez-Hernández, M. A. 2018. Alteraciones moleculares inducidas por fructosa y su impacto en las enfermedades metabólicas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 39(3): 491-504.
- Major, C. A., Ryan, K., Bennett, A. J., Lock, A. I. and Salter, A. M. 2008. Inhibition of stearoyl CoA desaturase activity induces hypercholesterolemia in the cholesterol-fed hamster. *J Lip Res*. 121(9): 1456-1465.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, 35(5): 153-166.
- Mason, P., Liang, B., Li, L., Fremgem, T., Murphy, E. and Quinn, A. 2012. SCD1 Inhibition Causes Cancer Cell Death by Depleting Mono-Unsaturated Fatty Acids. *PLoS ONE*. 7(3): e33823.
- Mauvoisin, D., Charfi, C., Lounis, A., Rassart, E. and Mounier, C. 2013. Decreasing stearoylCoA desaturase-1 expression inhibits β -catenin signaling in breast cancer cells. *Cancer sCl*. 31(4): 1436-1442.
- Melo Reis, E., Zanatta, M., Carmona, M. and Machado, O. 2015. Relationship between IC50 determined in vitro/in vivo and the fungicide rate used. *Summa Phyt*, 23(2): 49-53.
- Menendez, J., and Lupu, R. 2007. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(1): 763-777.
- Minville Walz, M., Pierre, A. S., Sandrine Bellenger, L. P. and Jerome Bellenger, C. F. 2010. Inhibition of stearoyl CoA Desaturase 1 Expression Induces CHOP-Dependent Cell Death in Human Cancer Cells. *Plos One*, 31(4): 1371-1379.
- Morales Cano, K. L. 2018. Efecto del consumo de aceite estercúlico y aceite de alga sobre el tejido adiposo y tejido hepático de ratas Wistar con síndrome metabólico. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, México.

- Mujumdar, A., Naik, D., Waghole, R., Kulkarni, D. and Kumbhojkar, M. 2000. Pharmacological studies on *sterculia foetida* Leaves. *Pharm Biol.* 113(7): 13-17.
- Murray, A. 1992. Cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature.* 359(1): 599-604.
- Nitao, Z., Pushkar, B., Queiroga, V. and Oliveira, J. 2008. *Sterculia striata* seed kernel oil: Characterization and thermal stability. *Grasas y aceites.* 59(2): 160-165.
- Olivares Moreno, G. 2010. Efecto de la suplementación dietética de ácidos grasos N-3 sobre la Expresión de los genes SCD1, SCD5, Elongasa 5 y Elongasa 6 en individuos obesos de 10 a 16 años. Secretaría de México, CDMX, México.
- Ortinau, L., Nickelson, K., Stromsdorfer, K., Naik, C., Pickering, R. and Haynes, R. 2013. Sterculic oil, a natural inhibitor of SCD1, Improves the metabolic state of obese OLEFT rats. *Obesity,* 23(2): 344-352.
- Palakurthi, S. S., Flückiger, R., Aktas, H., Changolkar, A. K., Shahsafaei, A., and Harneit, S. 2000. Inhibition of Translation Initiation Mediates the Anticancer Effect of the n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Can Research,* 39(7): 2919-2915.
- Pearce AK, H. 2001. Integrating stress-reponse and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol,* 11(2): 426-433.
- Ramírez-Higuera, A., Peña-Montes, C., Herrera-Meza, ., Mendoza-López, S., Valerio-Alfaro, G. and Oliart-Ros, R. M. 2019. Preventive action of sterculic oil on metabolic syndrome development on a fructose-induced rat model. *J Med Food.* Publicado en línea: <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0177>
- Ramírez-Sánchez, S. and Rivera, G. 2014. Cellular and molecular effect of antitumor agents. *Acta universitaria,* 24(4): 15-20.
- Rodríguez-Fragoso, L., Hernández, E. and Reyes Esparza, J. 2004. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biot Ap,* 21(2): 59-69.
- Rohem, J., Lee, D., Wales, J., Polityka, S., & Sinnhuber, S. 1970. The Effect of Dietary Sterculic Acid on the Hepatic Lipids of Rainbow Trout. *J Nutr.* 102(1): 80-85.
- Santos, C., and Schulze, A. 2012. Lipid Metabolism in Cancer. *FEBs Journal.* 172(2): 2610-2623.
- Scaglia, N. 2005. Papel de la Esteroil Co-A Desaturasa en el fenotipo celular neoplásico. Tesis de Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina.
- Scaglia, N., Chisholm, J. W. and Igal, R. A. 2009. Inhibition of steroilCoA Desaturase-1 Inactivates Acetyl-CoA Carboxylase and Impairs Proliferation in Cancer Cells: Role of AMPK. *Plos ONE,* 4(8), 1-13.

Schmid, K. and Patterson, G. 1988. Effects of cyclopropenoid fatty acids on fungal growth and lipid composition. *Lip Journal*. 147(2): 248-252.

Simon, G. 2013. Inducción de apoptosis por los agentes antitumorales mitocondriotóxicos trióxido de arsénico y Ionidamina y su modulación por agentes fenólicos naturales. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética., Madrid.

Simons, K. and Toomre, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Mol Cel Biol*, 214(5):237-243.

Smart, E., Graf, M., McNiven, G., Sessa, W. and Engelman, J. 1999. Caveolins Liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cel Biol*. 225(7): 7289-7304.

Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M., Setlow, B. and Redline, R. 1974. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad*. 47(3): 4565-4569.

Stukey, J., McDonough, V. and Matin, C. 1990. 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*. 123(5): 20144-20149.

Thai, S., Allen, J., De Angelo, A., George, M. and Fuscoe, J. 2001. Detection of early gene expression changes by differential display in the livers of mice exposed to dichloroacetic acid. *Carcinogénesis*. 22(8): 1317-1322.

Urrutia Vera, O. 2010. Efecto de la dieta en la expresión génica de las enzimas Acetil-Coa Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Estearoil-Coa Desaturasa, enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos insaturados en el depósito subcutáneo de ovino. *PFC-IAP*, 65(3): 14447-14453.

Vasquez, R., Howell, B., Yvon, A., Wadsworth, P. and Cassimeris, L. 1997. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cel*. 57(4): 945-1173.

Vazquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P. and Cassimeris, L. 1997. Nanomolar Concentration of Nocodazole Alter Microtubule Dynamic Inestability in Vivo and in Vitro. *Mol Biol Cel*. 8(4): 973-985.

Villa-Vásquez, S. S., Márquez-Fernández, M. E. and Camargo-Guerrero, M. 2018. Actividad citotóxica y genotóxica de ácidos grasos omega en células de cáncer de próstata PC-3. *IATREIA*. 31(4): 351-361.

Von Roemling, C. A., Marlow, L. A., Cooper, S. J., Caulfield, T. R., Wu, K., and Tan, W. W. 2013. Stearoyil-CoA Desaturase-1 is a Novel Molecular Therapeutic Target for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Can Res*, 19(9): 2368-2379.

Wang, W., Ao, L., Rayburn, E. R., Xu, H., Zhang, X. and Zhang, X. (2012). KCN1, a novel synthetic sulfonamide anticancer agent: in vitro and in vivo anti-pancreatic cancer activities and preclinical pharmacology. *Pub Lib Scien One*. 7(9): e44883.

Weinhold, P., Charles, L., Rounsifer, M., & Feldman, D. 1991. 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*, 79(6): 6093-6100.

WHO. (12 de septiembre de 2018). Organización Mundial de la salud. Recuperado el 11 de Octubre de 2018, de World Health Organization: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Zamora S., J. D., Otárola A., I. C. and Brenes G., O. 2005. La apoptosis y su relación con diferentes nutrientes. *Rev Chil Nut*. 32(3): 178-190.

Zhang, Z., Dales, N. A. and Danielle., W. M. 2013. Opportunities and Challenges in Developing stearyl-Coenzyme A Desaturase-1 Inhibitors as Novel Therapeutics for Human Disease. *J Mol Chem*. 237(4): 1987-1992.

APÉNDICE A

Evaluación de viabilidad celular por el método MTT

Se sembraron 30,000 células por cada pozo en placas de 24 pozos, se contaron con cámara de Neubauer para sembrar únicamente células viables por método de azul tripán, los tratamientos se aplicaron cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%. Al alcanzar la confluencia deseada (a las 48 h de haber sembrado las células), se aspiró el medio de cultivo celular de cada pozo y se aplicaron concentraciones de acuerdo a lo requerido para cada ensayo (0.1, 1, 2, 3, 4 y 5 mmol/L de aceite estercúlico diluido en etanol al 1%), en cada pozo se depositaron 500 μ L. Como referencia negativa se utilizó medio de cultivo con 1% de etanol y se agregaron dos controles más conteniendo aceite de soya (0.1, 1, 2, 3, 4 y 5 mmol/L de aceite de soya diluido en etanol al 1%). Los tratamientos se dejaron incubar por 48 h bajo una atmósfera del 5% de CO₂, 95% de O₂ a 37°C. Después del tiempo de incubación se aspiraron todos los tratamientos y se adicionó a cada pozo 40 μ L del reactivo MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) a una concentración de 5mg/mL. Posteriormente se incubaron las células en 5% de CO₂, 95% de O₂ a 37°C durante 2 h.

Finalmente, se añadieron 200 μ L de DMSO (Dimetil sulfóxido) a cada pozo. La lectura de placas se realizó a 595 nm utilizando un lector Beckman Coulter (DTX 880, Multimode Detector).

APÉNDICE B

Marcaje de las células para ensayos de ciclo celular

Las células suspendidas en medio de cultivo se centrifugaron 2 min a 3000 rpm con el fin de retirar el medio de cultivo, posteriormente se realizaron tres lavados con las soluciones amortiguadoras que incluye el kit (1 mL de cada solución), se suspendió de forma suave para no romper las células. A continuación se eliminó el sobrenadante por completo y se añadieron 250 μ L en cada tubo de la solución A (tripsina en tetrahidrocloreuro de espermina), se mezcló suavemente por pipeteo tres veces y se incubó 10 min a 20-25°C. Posteriormente, se añadió a cada tubo 200 μ L de la solución B (ribonucleasas e inhibidores de tripsina), se mezcló de forma suave, y las muestras se incubaron 10 min más en oscuridad (2-8°C). Finalmente, las suspensiones celulares se filtraron en tubos de 12x75 mm utilizando una membrana de nylon y fueron leídas en el citómetro de flujo BD FACS Aria™ Cell sorter de BD Biosciense, 30,000 células por muestra.

APÉNDICE C

Marcaje de las células para ensayos de apoptosis

Las células suspendidas en medio de cultivo se centrifugaron (Mini spin Plus; 2 min a 3000 rpm) para retirar el medio de cultivo, y se realizaron dos lavados a cada muestra con 1mL de PBS (Amortiguador salino de fosfatos), se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se suspendió en 100 μ L del componente C (amortiguador de unión anexina 1X), a continuación se añadieron 5 μ L del componente A (Anexina V-FITC) y 1 μ L de PI (ioduro de propidio, 100 μ g/mL), las células se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, se añadieron 400 μ L del componente C mezclando suavemente, y las muestras se mantuvieron en hielo y en oscuridad hasta su análisis. Finalmente las suspensiones celulares se filtraron en tubos de 12x75 mm utilizando una membrana de nylon, y la fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo BD FACS AriaTM Cell sorter, 10,000 células por muestra.

APÉNDICE D

Extracción de RNA, electroforesis en gel de agarosa, y síntesis de cDNA

Protocolo de extracción RNA total a partir de cultivos celulares

Se agregó 1 mL de Trizol para cada placa de 25 cm² y se homogeneizó por retro aspiración con la micropipeta; después de 5 min a temperatura ambiente, se pasó el homogenizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadieron 200 µL de cloroformo a cada placa, se agitó durante 15 s y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó a 9,000 xg por 15 min a 4 °C. En cada tubo se obtuvieron tres fases: la inferior u orgánica es DNA, la superior o inorgánica contiene RNA y la intermedia contiene proteínas. En este caso se conservó la fase superior en un nuevo tubo Eppendorf con 0.5 mL de isopropanol, esto se realizó con cuidado para extraer únicamente la fase de interés sin contaminar la muestra. Se incubó 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 5,600 xg durante 10 min a 4°C. A continuación se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75% a 4 °C, se homogeneizó y se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante con cuidado para no perder la muestra de RNA y eliminar la mayor cantidad posible de etanol. Finalmente, el pellet de RNA se resuspendió en 25 µL de agua libre de RNAsas y se cuantificó por absorbancia a 260 y 280 nm en un equipo NanoDrop™ 1000 spectrophotometer by Thermo Fisher scientific.

B) Verificación de la integridad de RNA

Para verificar la calidad del RNA obtenido se utilizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 %.

Se preparó el gel para electroforesis mezclando 7 mL de TBE 1X (solución salina tamponada), 63 mL de agua MiliQ y 1.4 g de agarosa, la mezcla se calentó y con agitación constante hasta eliminar grumos, se vertió en el molde de 5cm por 7 cm, se colocó el peine de 10 pozos y, después de polimerizar, se colocó el gel en el recipiente para electroforesis. Se colocaron las muestras en cada pozo preparadas de la siguiente forma: 2 μ L de red gel, 2 μ L de muestra (cada muestra contenía 10 μ g) y 2 μ L de amortiguador de carga 6X (Azul de bromofenol). Se colocó en el primer pozo un marcador de tamaño molecular que contenía 2 μ L de red gel, 1 μ L de marcador de tamaño molecular Invitrogen™ Millennium Markers™ RNA Markers y 2 μ L de amortiguador de carga para electroforesis PCR-254-BL de Jena Bioscience. La electroforesis corrió durante 1 h a 70 V. Posteriormente, se analizó el gel en un equipo ChemiDoc XRs+ con software Image Lab 6.0.

Obtención del cDNA

El ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Thermo scientific RevertAid First strand cDNA synthesis Kit) en un solo paso. Para obtener 10 μ L de cDNA por cada muestra, se mezclaron 2 μ L de Reaction buffer 5X, 0.5 μ L de Ribo Lock, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 0.5 μ L de Oligo dT, 0.25 μ L de Revert Aid enzyme y 200 ng del RNA de la muestra. La mezcla se realizó en un tubo para PCR, mezclando suavemente y centrifugando brevemente a máxima velocidad. La mezcla se incubó a 42°C durante 60 min y se terminó a 70°C durante 5 min. El cDNA obtenido se utilizó para los ensayos de Q-PCR.

APÉNDICE E

Ensayo de Western Blot

A) Cuantificación de proteínas

En un papel filtro de 5 por 7 cm, se colocaron gotas de 1 μ L de las muestras de proteína estándar (albúmina) por triplicado para hacer una curva y tenerla como referencia. La proteína estándar se diluyó en RIPA a concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 1, 0.75, 0.5, 0.25 y 0.1 μ g/mL. Posteriormente se agregaron gotas de 1 μ L de cada muestra de proteína por triplicado, se dejó secar durante 15 min. Se depositó el papel en una charola cubriéndola con metanol y agitando 5 min. Se retiró el papel y se secó, posteriormente se depositó en una charola cubriéndola con reactivo EZQ Protein Quantitation y agitando por 30 min. A continuación se realizaron tres lavados con agitación de 5 min cada uno en amortiguador de lavado (metanol 10%, ácido acético 7% y agua). En cada lavado se dejó secar el papel. La proteína se reveló a 300 nm y tiempo de exposición de 0.5 s mediante el equipo ChemiDoc XR⁺ con software Image Lab 6.0. La determinación de la concentración de proteínas en cada muestra se realizó comparando la lectura de cada muestra con la curva estándar que se obtuvo con las concentraciones conocidas de albúmina y mediante interpolación de los datos.

B) Preparación de los geles y electroforesis.

Se preparó primero el gel separador al 12% de acrilamida mezclando 1.9 mL de agua, 2.4 mL de acrilamida/bis, 1.56 mL de Tris Base 1.5 M, pH 8.8, 60µL de SDS al 10%, 60µL de persulfato de amonio al 10% y 6µL de TEMED. Se vertió el gel en el molde y se esperó a que polimerizara. En seguida se preparó el gel concentrador mezclando 1.78 mL de agua, 750 µL de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 30µL de SDS al 10%, 400 µL de Acrilamida/Bis (30%/0.8%), 30 µL del persulfato de amonio al 10% y 3 µL de TEMED. En la parte superior del gel separador, se vertió el gel concentrador dejándole una altura de 2 cm y colocando un peine para 10 pozos. En cada pozo se colocaron 10 µg de proteína previamente diluida en amortiguador de carga Laemmli 2X en relación 1:1 y calentada 5 min a 95°C. El mismo tratamiento recibió el marcador de peso molecular (see blue de Invitrogen). Mientras las muestras se cargaban en el gel, se conservaron a 4°C. Después de colocar 20 µL de muestra en cada pozo, se agregó el Running Amortiguador 1X pH 8.3 a la cámara de electroforesis y se dejó correr 30 min a 70V e inmediatamente 90 min a 100V.

C) Transferencia de la proteína e incubación con anticuerpos.

Se cortó una membrana PVDF de 5 x 8 cm y se activó dejándola 5 min en agitación con 10 mL de metanol y posteriormente 20 min en agitación con amortiguador de transferencia (Tris Base 5.81g, Glicina 2.92 g, Metanol 200 mL, SDS 0.4 g, Agua MQ 800 mL). Se colocó en la cámara de transferencia en orden, de abajo hacia arriba, un colchón de 8 capas de papel filtro Whatman grado GB003, la membrana de PVDF, el gel y otro colchón. Cada colchón fue humedecido previamente por capilaridad con amortiguador de transferencia a 4°C. La transferencia se realizó a 15V durante 45 min. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana, se le hizo una tinción colocándola en una charola con 15 mL de rojo de

Ponceau en agitación por 5 min. Por otro lado, para verificar el corrimiento de las proteínas en el gel, se le hizo una tinción con azul de Coomassie agitando por 2 h.

Después de la transferencia se colocó la membrana en una charola y se cubrió con una solución de leche al 5% en TBST 1X/Tween 0.1% a pH 7.6 para el bloqueo por 2 h en agitación a temperatura ambiente. Después de este tiempo se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBST 1X y se colocó el anticuerpo primario (1:300 para SCD con número de catálogo sc-58420 de santa Cruz Biotechnology y 1:40,000 para GAPDH con número de catálogo AB8245 de Abcam), el anticuerpo se diluyó en una solución de TBST 1X/Tween 0.1% a pH 7.6 y leche al 1%. Se incubó con el anticuerpo primario a 4°C en agitación durante toda la noche cubierto con parafilm. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con amortiguador TBST 1X/Tween 0.1 % a pH 7.6 en agitación constante. A continuación se cubrió la membrana con 10 mL de anticuerpo secundario (1:1000 para SCD con número de catálogo sc-516102 de santa Cruz Biotechnology y 1:20,000 para GAPDH con número de catálogo 7076 de Cell Signaran Technology) en una solución de TBST 1X/Tween 0.1% a pH 7.6 y se dejó en agitación constante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con agitación constante en amortiguador TBST 1X/Tween 0.1% a pH 7.6. Finalmente se aplicó a la membrana 1 mL del revelador (Luminata™ Forte Western HRP substrate de Millipore) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La lectura se realizó en un equipo ChemiDoc XRs+ con software Image Lab 6.0, los tiempos de exposición fueron de 30 s capturando imágenes cada tres s. El análisis de las bandas se realizó con el software Image J 5.2.

APÉNDICE F

Extracción de lípidos celulares.

Se aspiró el medio de cultivo de cada tratamiento, y se enjuagó cada frasco con 1 mL de PBS (amortiguador salino de fosfatos); se agregó 1 mL de tripsina (0.05%) a cada frasco y se incubó durante 3 min a 37°C para permitir la separación de la monocapa celular, se aspiraron las células y se centrifugaron con 100 µL de SFB (suero fetal bovino). Se retiró el sobrenadante y el paquete se lavó cuatro veces en PBS. Se suspendió el paquete en 1 mL de agua MiliQ y se agregó a cada tubo 4 mL de metanol frío (-20°C) y 2 mL de cloroformo (solución de Bligh and Dyer, Metanol: Cloroformo: Agua, 2:1:0.5 por volúmenes), se homogeneizó la mezcla y se dejó en agitación durante la noche a -4°C. En suida se agregó a cada tubo 1 mL de cloroformo y 1 mL de agua MQ para particionar el sistema y poder eliminar los contaminantes no lipídicos junto con la fase acuosa. El sistema turbio se clarificó centrifugando 5 min a 3,000 rpm y luego se aspiró la fase acuosa (superior). La fase clorofórmica (inferior), que contenía los lípidos, se pasó a un tubo de vidrio con tapa de teflón y se llevó a sequedad en un equipo Thermo Savant sc110a Plus with Uvs400 Speedvac system. Los lípidos se suspendieron en hexano para su metilación y análisis por CG-EM.

APÉNDICE G

Volumen de aceite de soya, maíz y estercúlico utilizado en los cultivos celulares.

Un mol de ácido estercúlico pesa 294 g, como el aceite estercúlico contenía un 34% de ácido estercúlico, cada gramo de aceite contenía 0.34 g de ácido estercúlico, con esta información se puede calcular que 1 mol de ácido estercúlico está contenido en 864.7 g de aceite. La densidad del aceite estercúlico fue de 0.9 g/mL, por lo tanto, 864.7 g equivale a un volumen de 960.7 mL de aceite estercúlico. Como no se tenían 960.7 mL de aceite, se preparó una solución inicial de 520 mM de ácido estercúlico y a partir de esta se hicieron las diluciones. Con esta información se pudo elaborar la Tabla G1 para indicar el volumen de aceite y de etanol necesario para preparar 10 mL de las soluciones a utilizar en los ensayos.

TABLA G1. Soluciones molares de aceite estercúlico

Concentración molar	Volumen de aceite estercúlico	Volumen de etanol
100 mM	1.92 mL	8.08 mL
200 mM	3.84 mL	6.16 mL
300 mM	5.76 mL	4.24 mL
400 mM	7.69 mL	2.71 mL

Para los ensayos con aceite de soya y maíz se utilizaron las mismas cantidades que de aceite estercúlico. Al agregar las diluciones de aceite-etanol a las placas de cultivo se hacía en relación de volumen 1:100 de modo que quedara una concentración de 1, 2, 3 o 4 mM.

APÉNDICE H

Cálculos de viabilidad celular y de concentración inhibitoria media (IC50)

Para los cálculos de viabilidad celular se construyó una tabla como la que se muestra a continuación.

TABLA H1. Cálculos de viabilidad celular

	0mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Réplica 1					
Réplica 2					
Réplica 3					
Promedio					
Viabilidad					

Los resultados del lector de placas (en la región azul) se promediaron (en la región naranja), se dividió el promedio de cada columna (1, 2 3 y 4 mM) entre el promedio de la primera columna (0mM) (en la región gris).

La IC50 es la concentración que puede inhibir la viabilidad del 50% de la población celular, es un parámetro homólogo a la LD50 que se define como la dosis que puede provocar la muerte al 50% de los animales en una prueba. Para el cálculo de la IC50, se construyó la siguiente tabla con los resultados de viabilidad de cada ensayo.

TABLA H2. Cálculos de la IC₅₀

Ácido estercúlico (mM)	% de viabilidad celular obtenido en cada réplica											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3.40	51.10	50.80	50.60	50.80	51.10	50.90	50.90	51.00	50.80	51.00	50.90	51.00
3.60	50.40	50.40	50.60	50.40	50.40	50.60	50.60	50.60	46.90	50.60	50.20	50.60
3.80	49.60	49.60	49.40	49.60	50.00	49.40	49.80	49.60	49.40	49.40	49.40	49.60
4.00	49.07	49.12	48.45	47.75	49.31	50.54	48.94	48.08	42.81	44.61	48.76	48.10

Con los datos de la tabla se hizo una curva dosis-respuesta.