

Estudio de los efectos de la inhibición de la vía del mevalonato en la proliferación celular.

Silvia Calvo Serrano^{1, 2, a}, Gema de la Peña², Miguel Ángel Lasunción²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRyCIS, Madrid y CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición.

a. silcalser@gmail.com

Palabras clave: Mevalonato difosfato descarboxilasa; HMG-CoA reductasa; mevalonato; ATP; HL-60

Resumen

El colesterol es un esteroide de gran relevancia para la supervivencia celular y la falta sostenida del mismo supone un estrés que produce la interrupción del ciclo celular. En su biosíntesis interviene un gran número de enzimas. El mevalonato, intermediario generado por acción de la HMG-CoA reductasa, se fosforila y por acción de la mevalonato difosfato descarboxilasa (MVD) se transforma en isopentenil difosfato (IPP) con gasto adicional de ATP. La inhibición experimental de esta enzima en ausencia de colesterol en células deficientes de p53 produce una parada del ciclo en fase S por deficiencia de dNTPs. Los dNTPs son sintetizados por la ribonucleótido reductasa (RNR), que tiene como activador al ATP. En el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos sobre la proliferación, el tamaño, el ciclo celular y la homeostasis del ATP intracelular, causados por la inhibición de la MVD, la HMG-CoA reductasa y la ATP sintasa, en células HL-60, para establecer una relación entre el gasto de ATP en la ruta del mevalonato y la interrupción de la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo. Hemos observado que la inhibición de la MVD produce un descenso de la proliferación y un aumento del tamaño celular debido a la parada del ciclo celular en fase S, que podría estar relacionada con el descenso de las concentraciones intracelulares de ATP observado en estas células y el consiguiente estrés replicativo. Esta situación se agrava suministrando mevalonato y se revierte parcialmente limitando el aporte de mevalonato por inhibición de la HMG-CoA reductasa.

Cita: Calvo Serrano, Silvia; de la Peña, Gema; Lasunción, Miguel Ángel (2018) Estudio de los efectos de la inhibición de la vía del mevalonato en la proliferación celular. *dianas* 7 (2): e20180901. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e20180901. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Calvo-Serrano S, de-la-Peña G, Lasunción M. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El ciclo celular es un conjunto de procesos por los cuales las células crecen y replican su genoma, conduciendo a su división en dos células hijas. En eucariotas se divide en cinco fases. Una célula quiescente, en fase G₀, puede salir de este estado ante determinados estímulos proliferativos y entra en fase G₁, donde aumenta su tamaño y contenido celular, preparándose para la fase de síntesis, fase S, en la cual se da la replicación del ADN. Tras la replicación, la célula se prepara para la división en la fase G₂ y, tras alcanzar las condiciones adecuadas, se da la mitosis, fase M [1]. Estos sucesos están estrictamente controlados; principalmente por complejos ciclina-CDK, serina-treonina quinasas que fosforilarán a sus sustratos, necesarios para la síntesis y activación de factores implicados en el ciclo celular [1].

Ante diferentes tipos de estrés, se produce la parada del ciclo celular en los puntos de control o “*checkpoints*”. Si el proceso previo al punto de control no se ha completado correctamente, la célula detiene el ciclo. Por ejemplo, cuando se produce un daño en el ADN, de forma general las células se detienen en G₁ gracias a la proteína p53 [2]. Otros factores, como la falta sostenida de colesterol, producen el bloqueo del ciclo en estos puntos de control [3, 4].

El colesterol es un esteroide con gran relevancia fisiológica. Es un componente esencial de la membrana plasmática, sobre todo en las balsas lipídicas, y es fundamental para las propiedades fisicoquímicas de la misma, como la fluidez/rigidez o la permeabilidad [5]. Además, es el precursor de las hormonas esteroídicas y de las sales biliares, y es ligando de ciertos receptores de membrana [6].

Las células pueden obtener el colesterol mediante captación desde el medio externo o síntesis endógena a partir de acetil-CoA. La biosíntesis del colesterol es un largo proceso que discurre entre el citoplasma, el retículo endoplasmático y los peroxisomas [7]. Dos enzimas importantes son la HMG-CoA sintasa, que genera HMG-CoA a partir de una molécula de acetoacetil-CoA y otra de acetil-CoA, y la HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la ruta que produce mevalonato a partir del HMG-CoA. El mevalonato sufre una serie de fosforilaciones, con gasto de ATP, en la denominada “ruta del mevalonato”, generándose finalmente isopentenil-PP (IPP) por acción de la mevalonato difosfato descarboxilasa

(MVD). El IPP será procesado por diversas enzimas, generando una serie de isoprenoides con gran importancia celular y, en última instancia, colesterol. La ruta del mevalonato tiene una regulación muy precisa por producto final, el colesterol, y por diversos intermediarios [3].

La utilización de inhibidores de las distintas enzimas permite estudiar el papel de los diferentes intermediarios, esteroides o no, y del propio colesterol. En cuanto a la proliferación y ciclo celular, se pudo demostrar, mediante el empleo de inhibidores terminales de la biosíntesis de colesterol, que la carencia del mismo conduce a una parada del ciclo celular en la fase G₂/M en células HL-60, efecto prevenido y revertido por el colesterol [3, 4]. A nivel molecular, el colesterol induce la expresión de ciclina B1 y la activación de Cdk1, lo cual permite la transición de G₂ a mitosis [3, 4], aunque también es necesario para que se complete la citocinesis [8].

Las estatinas son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa que se utilizan para el tratamiento de la hipercolesterolemia. A dosis terapéuticas inhiben parcialmente la síntesis de mevalonato y de colesterol. Esto es suficiente como para estimular la expresión del LDLR, aumentando la captación y disminuyendo la concentración plasmática de colesterol-LDL. Experimentalmente, las estatinas pueden inhibir la proliferación celular. A dosis relativamente bajas y tiempos mayores de 48 horas, producen una parada en la fase G₂/M por falta de colesterol, mientras que a dosis altas producen una parada del ciclo en G₁ por falta de isoprenoides no esteroides. Esta situación se revierte suministrando colesterol, para el avance desde G₂, y algún intermediario de la ruta de biosíntesis, para la entrada en la fase S [9].

La inhibición de la MVD con fluoromevalonato produce la acumulación de mevalonato-PP y una ligera disminución de la síntesis de colesterol [9,10] y, si las células se incuban en un medio sin colesterol, se inhibe la proliferación celular [11]. Este efecto se evita tratando simultáneamente las células con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa [11]. En nuestro laboratorio, en células deficientes de p53 se observó que la inhibición de MVD produce la parada del ciclo en la fase S, no tanto porque se alteraran las polimerasas, sino por la deficiencia de dNTPs, produciéndose una situación de estrés replicativo [9]. Este efecto probablemente es debido al gasto de ATP para la fosforilación del mevalonato [9].

El ATP es el nucleótido fundamental en el metabolismo energético y es necesario para la progresión del ciclo celular. La replicación del ADN requiere ATP como fuente de energía y dNTPs como precursores [12]. La ribonucleótido reductasa (RNR) cataliza la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos [13], manteniendo los niveles óptimos de los mismos [14]. Se demostró que agentes que inducen estrés replicativo, como el inhibidor de la RNR hidroxiurea, provoca la acumulación de células en fase S y que los desoxirribonucleótidos revertían parcialmente ese efecto [15]. La RNR es regulada por diversos mecanismos y moléculas, siendo el ATP un activador [9, 13].

La hipótesis de partida es que la inhibición experimental de la MVD se traduce en un descenso de los niveles de ATP por el gasto producido para la fosforilación del mevalonato en las reacciones previas a la acción de esta enzima.

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar los efectos de la inhibición de la MVD sobre la proliferación, el ciclo celular, el tamaño y los cambios en la concentración del ATP intracelular, para establecer una relación entre el gasto de ATP en la ruta del mevalonato y la interrupción de la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo. De igual modo, se pretende estudiar los efectos de la inhibición de las enzimas HMG-CoA reductasa y ATP sintasa, y los efectos de la adición del mevalonato.

Material y métodos

Cultivos celulares

Para este estudio se utilizó la línea celular HL-60 (ECACC 98070106) de la Colección Europea de Cultivos Celulares, que procede de la derivación de leucocitos de sangre periférica de una paciente de 36 años con leucemia promielocítica aguda. Estas células carecen de p53 funcional y crecen en suspensión. A diferencia de las células que disponen de p53, ante una deficiencia de colesterol las HL-60 no se detienen en G₀/G₁ [3]. Esto permite estudiar las acciones del colesterol y de otros intermediarios de la ruta biosintética más allá de G₁.

Las células se mantienen en un medio de congelación, uno de descongelación y uno de mantenimiento. El stock de células se mantuvo en un medio de congelación compuesto por una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en suero bovino fetal (FBS) (v/v). Para la descongelación se empleó un medio RPMI 1640 suplementado con FBS, antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 U/ml, gentamicina 100 µg/ml) (Gibco, BRL) y glutamina 2 mM (Gibco, BRL).

El mantenimiento de los cultivos y los experimentos del trabajo se llevaron a cabo en un medio libre de suero y colesterol, compuesto por RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con transferrina 625 µg/ml (Roche), insulina 625 µg/ml, ácido linoleico 535 µg/ml, selenito sódico 625 µg/ml (Sigma-Aldrich) y albúmina humana 125 mg/ml (Grifols), denominado medio "ITS+". Dicho medio fue a su vez suplementado con los mismos antibióticos, y glutamina, empleados en el medio de descongelación.

Se descongeló un vial de células conservadas en nitrógeno líquido de forma rápida en un baño a 37 °C y se sembraron en frascos de 75 cm² en medio de descongelación. Transcurridas 24 horas, se recogieron las células por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos para la eliminación de los posibles restos de DMSO y se resuspendieron en medio fresco. Se mantuvieron en estas condiciones durante 5 días hasta que adquirieron un crecimiento exponencial y, después, se cambió el medio pasándose a ITS+ en el que se realizaron los diferentes experimentos. Las células se mantienen siempre a 37 °C con un 5% de CO₂.

Para no alterar las condiciones de cultivo y mantener una tasa de proliferación normal, los cultivos se mantuvieron a una densidad celular no superior a las 8x10⁵ células/ml. Para ello, se realizaron recuentos periódicos empleando un hemocitómetro, por el método de exclusión de azul tripán.

Para los experimentos se utilizaron células en crecimiento exponencial, asincrónicas. Estas fueron tratadas con: un inhibidor de la MVD, "I1"; mevalonato; oligomicina; un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, "I2"; y combinaciones de estos compuestos, para el posterior análisis de su efecto sobre la densidad y tamaño de las células, el ciclo celular y la concentración de ATP. Se sembraron las células a una densidad de 1,5x10⁵ células/ml en placas p6 y se incubaron a 37°C durante 22 horas. Como controles se utilizaron células sin tratar.

Recuento de células: Ensayo de exclusión de azul tripán y Countess

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se tomó un volumen del cultivo, previamente homogeneizado, y se mezcló con otro volumen de azul tripán 0,4% (Sigma-Aldrich). Se procedió al recuento de las células excluyendo aquellas positivas para azul tripán, que presentan alteración en la integridad de la membrana plasmática y son "no viables". El número de células por ml de cultivo se obtuvo realizando el siguiente cálculo: (nº obtenido en el hemocitómetro/4) x2x1x10⁴.

Por otro lado, tras la adición de un volumen de azul tripán 0,4% (Invitrogen), también se realizó el recuento de células vivas utilizando el contador automático Countess (Invitrogen). Una vez realizado el recuento, mediante la aplicación de Countess se auditaron los resultados para descartar aquellos artefactos identificados como células por el contador. Se decidió utilizar este método porque, además del recuento, aporta datos sobre el tamaño de las células identificadas.

Citometría de flujo: análisis del ciclo celular

Mediante un análisis del ciclo celular se pueden establecer los efectos que cada tratamiento empleado tiene sobre las células, determinando la dotación genética en cada fase del ciclo, previo marcaje con yoduro de propidio. Las variaciones en la progresión del ciclo indican una alteración de la proliferación celular. La citometría de flujo permite estudiar parámetros como el tamaño y complejidad celular, midiendo la dispersión de la luz del láser con dos detectores situados en distintos ángulos: FSC y SSC. Por otro lado, también se puede cuantificar la cantidad de material genético mediante la fluorescencia del yoduro de propidio y calcular el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, mostrándolo como un histograma.

Tras los tratamientos correspondientes se tomaron alrededor de 1x10⁶ células por condición, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavaron con 5 ml de PBS 1X volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Seguidamente, se resuspendieron en 2 ml de etanol 70% para su fijación y permeabilización, y se guardaron en estas condiciones a -20 °C durante al menos 2 horas. A continuación, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante, y se lavaron con 5 ml de PBS 1X y se resuspendieron en una solución de PBS conteniendo yoduro de propidio a 0,05 mg/ml y ribonucleasa A (RNAsa) a 0,1 mg/ml (ambos de Sigma-Aldrich, EE.UU.). La ribonucleasa A se añade para evitar distorsiones durante el análisis, ya que el yoduro también interactúa con el ARN. Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C y, a continuación, se analizaron las muestras en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) en FL2, para la región de células viables. Los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.8 (Build #13 01-19-2000, Copyright Joseph Trotter) para estudiar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el tamaño celular y sobre la progresión del ciclo.

Determinación de la concentración de ATP

Después del recuento, se tomaron alícuotas con un número de células conocido para la determinación de ATP y para la cuantificación de proteínas por BCA.

Para la determinación de ATP se empleó el kit CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay (Promega). Este kit se basa en el requerimiento de ATP de la enzima luciferasa para la producción de luz, siendo la cantidad de luz detectada directamente proporcional al contenido de ATP. Para valorar el ATP intracelular de las muestras se preparó una curva patrón empleando concentraciones crecientes de un patrón de ATP, que permitió extrapolar la cantidad de ATP presente en ellas. En una placa p96 opaca se mezclaron un volumen de las diferentes concentraciones del estándar, y de cada condición, y un volumen de la mezcla de reactivos del kit, que se encontraban en una relación 1:1 de CellTiter-Glo Substrate y

CellTiter-Glo Buffer. Esta placa, en oscuridad, se agitó durante 2 minutos, se incubó 10 minutos y se leyó en el lector de placas MicroBeta® TriLux (EG&G Wallac). Los datos de ATP se expresaron por μg de proteína celular.

Determinación de la concentración de la proteína intracelular

Esta técnica se llevó a cabo empleando el kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce) en el que se combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ de las proteínas en un medio alcalino, con la detección colorimétrica del Cu^+ empleando como reactivo el ácido bicinonínico (BCA). La reacción de dos moléculas de BCA con una molécula de Cu^+ da un color morado que medido a una longitud de onda de 562 nm da un valor de absorbancia directamente proporcional al incremento de proteínas.

Para valorar la cantidad de proteína presente en las muestras se preparó una curva patrón empleando concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) lo que nos permitió elaborar una recta patrón para calcular por interpolación la cantidad de proteína presente en las muestras. Como blanco se usó agua. Tanto el blanco como el estándar y las muestras, previamente resuspendidas con KOH 10%, se cargaron en una placa p96 transparente por duplicado, tras lo cual se administra la mezcla de reactivos del kit. Se incubó 30 minutos a 37°C y los datos se leyeron a una absorbancia de 540 nm en un lector de placas SPECTRAFluor (Tecan).

Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como la media o mediana \pm error estándar (E.E.) de la media o mediana. Para la comparación estadística entre grupos se aplicó el test de ANOVA multifactorial, el test de ANOVA para un factor y el test de Student-Newman-Keuls utilizando el programa StatGraphics Plus 4.1.

Resultados

Efecto de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa sobre la proliferación y el tamaño celular

Se llevó a cabo un estudio del número de células viables, y de su tamaño, a las 22 horas de tratamiento. El primer método de análisis que se empleó fue el de exclusión de azul tripán empleando un hemocitómetro, que permitió establecer el número de células viables en los diferentes tratamientos. En la **Figura 1** se muestra que el tratamiento con I1 produce una disminución del número de células viables en el cultivo, tanto solo como en combinación con mevalonato, mientras que el mevalonato solo no lo altera. Por su parte, el tratamiento con oligomicina determinó un importante descenso del número de células en todos los casos. Por otro lado, el contador automático Countess aportó resultados similares a los comentados, confirmando importantes descensos por efecto de I1 y de oligomicina, pero no coincidían exactamente los datos en todos los casos, principalmente debido a la confusión en la asignación de algunas células a la categoría de “vivas” frente a “muertas” o “sin determinar”, por lo que se decidió no utilizar estos datos.

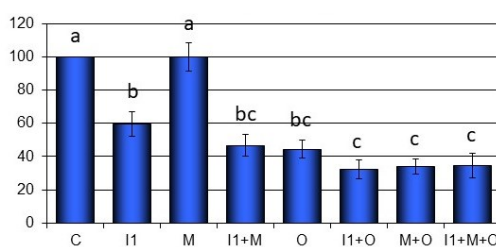


Figura 1.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μM (I1), mevalonato 10 mM (M), oligomicina 1 μM (O), y combinaciones de estos compuestos, o en condiciones control (C), sobre la densidad celular. Los resultados se expresan en % con respecto a la condición control de cada experimento, media \pm E.E. de 4 experimentos independientes analizados por duplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0.0007$; M, $P > 0.05$; O, $P < 0.0000$) y, después, mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0,000$. Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los grupos que no comparten ninguna letra sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

El contador automático Countess también mide el tamaño de las células (**Figura 2A**). A este respecto, es notable el aumento del tamaño de las células tratadas con I1 con respecto al control, que también se observa al combinarlo con mevalonato, mientras la oligomicina no produjo cambios significativos en este parámetro. Hay que señalar que el tamaño se refiere exclusivamente a las células vivas, que excluían el azul tripán. Por otra parte, mediante el citómetro se analizaron los parámetros FSC (dispersión frontal) y SSC (dispersión) que brindan unas medidas del tamaño y de la complejidad celular respectivamente. Como se observa en la **Figura 2B**, tanto uno como otro se encuentran aumentados en las células tratadas con I1, tanto solo como en combinación con mevalonato, con respecto a la condición control, mientras

que el tratamiento con oligomicina produjo un descenso más acusado en las células expuestas al mevalonato.

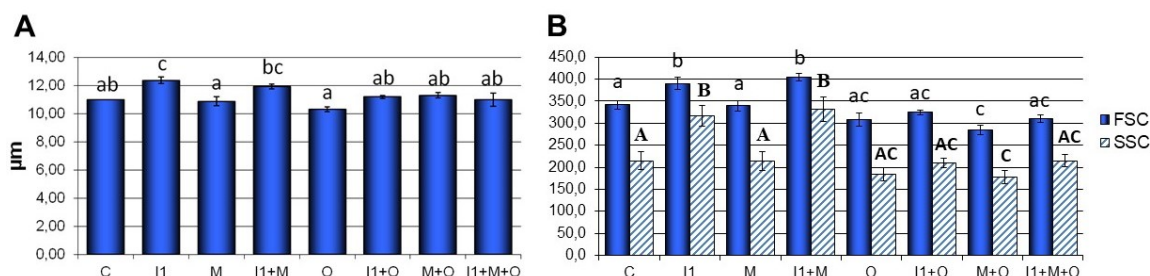


Figura 2.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (I1), mevalonato 10 mM (M), oligomicina 1 μ M (O), y combinaciones de estos compuestos, o en condiciones control (C), sobre el tamaño celular. (A) Tamaño en μ m de la mediana del tamaño celular obtenido mediante el Countess. Los resultados corresponden a la mediana \pm E.E. de 4 experimentos independientes analizados por duplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0,0000$; M, $P > 0,05$; O, $P < 0,05$) y, después, mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0,000$. Las comparaciones entre los distintos grupos se analizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. (B) Valor de la mediana de FSC y SSC. Los resultados se expresan en % con respecto a la condición control de cada experimento, mediana \pm E.E. de 4 experimentos independientes analizados por duplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0,0000$; M, $P > 0,05$; O, $P < 0,0000$) y, después, mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0,001$ (FSC) y $P < 0,000$ (SSC). Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los grupos que no comparten ninguna letra sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Efecto de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa sobre el ciclo celular

Se analizó la distribución del ciclo celular de células asincrónicas sometidas a los diferentes tratamientos. Como se muestra en la **Figura 3**, en la condición control la población mayoritaria correspondía a la fase S, seguido de G_0/G_1 (contenido de ADN 2n) y de G_2/M (4n), con unas proporciones de 50, 35 y 15 % aproximadamente. El mevalonato no alteró esa distribución mientras que el tratamiento con I1 la alteró notablemente, localizándose prácticamente todas las células en la fase S, lo que indica una parada del ciclo en la fase de replicación del ADN. La adición de mevalonato al medio de cultivo no alteró el efecto de I1, si acaso produjo una mayor acumulación de células en la fase S temprana. El tratamiento con oligomicina afectó gravemente el ciclo celular, alterando las proporciones de las células vivas e incrementando las células muertas (sub G_1).

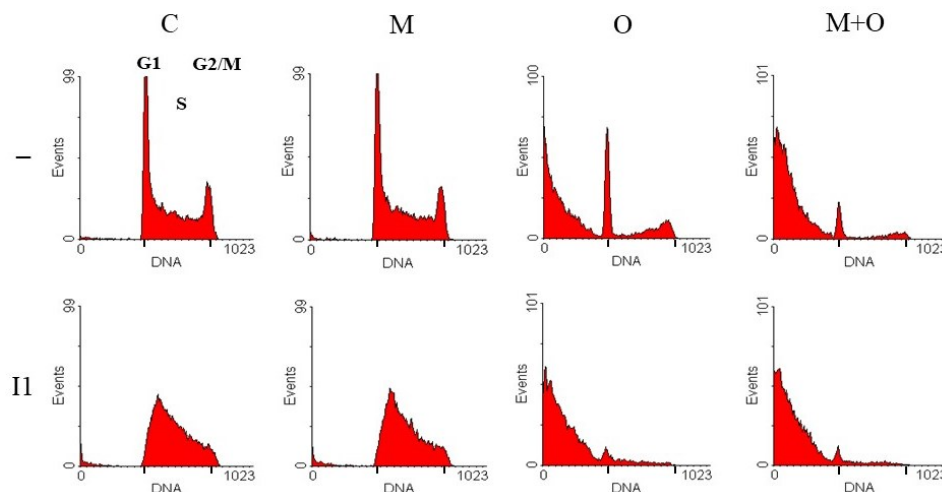


Figura 3.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (I1), mevalonato 10 mM (M), oligomicina 1 μ M (O), y combinaciones de estos compuestos, sobre el ciclo celular.

Efecto de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa sobre los niveles de ATP intracelular

La concentración celular de ATP se determinó con un método basado en bioluminiscencia y se calculó como μ mol/mg proteína celular y, luego, los resultados se normalizaron expresándolos en % respecto a su control (**Figura 4**). Como se puede observar, en las células tratadas con I1, cuando se consideran conjuntamente las condiciones de I1 en presencia y en ausencia de mevalonato, muestran un descenso en la concentración de ATP, mientras que el tratamiento con mevalonato solo no modifica este parámetro.

Por otro lado, la oligomicina produce un descenso estadísticamente significativo respecto al control del ATP intracelular en todos los casos y, en combinación con I1 o mevalonato, el descenso aún es mayor.

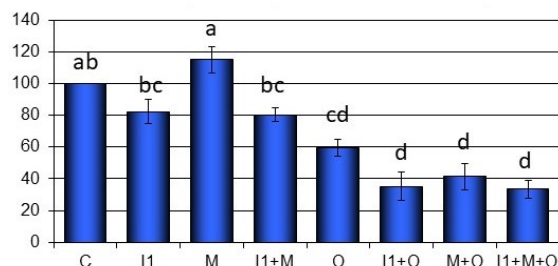


Figura 4.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (F), mevalonato 10 mM (M), oligomicina 1 μ M (O), y combinaciones de estos compuestos, o en condiciones control (C), sobre la concentración intracelular de ATP. Los datos se expresan como % del control de cada experimento y se muestran como media \pm E.E. de 3 experimentos, analizados en duplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0.0007$; M, $P > 0.05$; O, $P < 0.0000$) y después mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0,001$. Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los grupos que no comparten ninguna letra sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Prevención de los efectos de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa mediante la utilización de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa

Se decidió hacer un segundo estudio para estudiar los efectos de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (I2). La **Figura 5** representa la densidad celular de las diferentes condiciones empleadas. Se observa que, al igual que ocurría en la **Figura 1**, las células tratadas con I1 tienen una densidad significativamente menor, tras 22 horas de tratamiento, que las células controles. Del mismo modo ocurre con las células tratadas con una combinación de I1 y mevalonato, mientras que las células tratadas con mevalonato muestran una densidad similar a las células controles. En cuanto a las células tratadas con I2, estas muestran una ligera disminución de la densidad celular, aunque estadísticamente no significativa, respecto al control. La adición de I2 incrementó ligeramente la densidad celular de las tratadas únicamente con I1 de manera que desaparecieron las diferencias con respecto al control.

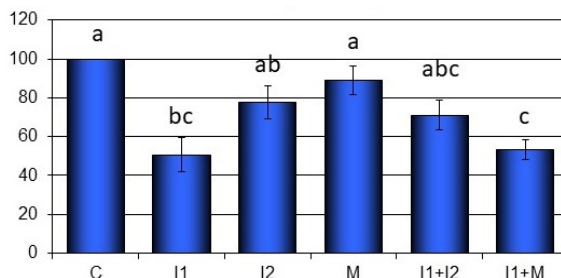


Figura 5.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (I1), I2 2,5 μ M, mevalonato 10 mM (M), y combinaciones de estos compuestos, o en condiciones control (C), sobre la densidad celular. Los resultados se expresan en % respecto al control y corresponden a la media \pm E.E. de 4 experimentos independientes analizados en duplicado. Los resultados se analizaron mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0.0000$; I2, $P > 0.05$; M, $P > 0.05$) y mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0,001$. Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los grupos que no comparten ninguna letra sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Respecto al ciclo celular, **Figura 6**, tanto las células control como las células tratadas con I2 y M muestran una distribución del ciclo normal. Confirmando los datos anteriores (**Figura 3**) I1 produjo una parada de las células en la fase S y su combinación con mevalonato aparentemente detuvo las células en etapas aún más tempranas. Sin embargo, las células tratadas con I1 e I2 muestran una distribución normal del ciclo celular.

Por último, la **Figura 7** muestra los valores de ATP intracelular. Además de confirmar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores (**Figura 4**) respecto al efecto de I1, solo o en combinación con mevalonato, esta figura muestra que las células tratadas con I2 no experimentan un descenso de la concentración de ATP con respecto al control. De forma interesante, la combinación de I2 con I1 hace que se incremente la concentración de ATP y desaparezcan las diferencias con respecto a la condición control.

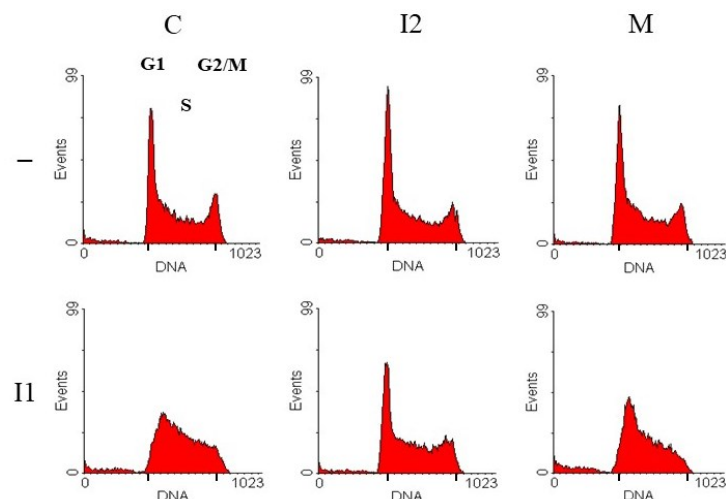


Figura 6.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (I1), I2 2,5 μ M (I2), mevalonato 10 mM (M), y combinaciones de estos compuestos, sobre el ciclo celular.

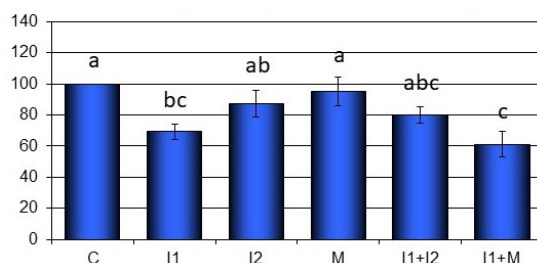


Figura 7.- Efecto del tratamiento de las células HL-60 durante 22 h con I1 100 μ M (F), mevalonato 10 mM (M), oligomicina 1 μ M (O), y combinaciones de estos compuestos, o en condiciones control (C), sobre la concentración intracelular ATP. Los datos se expresan como % del control de cada experimento y se muestran como media \pm E.E. de 3 experimentos analizados en duplicado. Los resultados se analizaron primeramente mediante ANOVA multifactorial (I1, $P < 0.0000$; I2, $P > 0.05$; M, $P > 0.05$) y después mediante ANOVA de un factor (tratamiento): $P < 0.001$. Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Los grupos que no comparten ninguna letra sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

Discusión

En el presente trabajo se ha profundizado en el conocimiento de los efectos de la inhibición de la mevalonato difosfato descarboxilasa (MVD) sobre la proliferación y el ciclo celular, estudiando su asociación con la homeostasis intracelular del ATP y determinando cómo afectan otras manipulaciones de la biosíntesis de colesterol. Para ello, se utilizó la línea celular HL-60 incubada en un medio definido libre de colesterol. Estas células presentan una alta actividad de la HMG-CoA reductasa, que tiene como consecuencia una elevada tasa de síntesis de mevalonato y de colesterol [16]. A diferencia de otras líneas celulares, estas células no se detienen en G₁ ante una deficiencia de colesterol, lo que permite estudiar las acciones de los distintos intermediarios de la biosíntesis de colesterol en las fases posteriores del ciclo.

La inhibición experimental de la MVD produce respuestas que pueden variar según la línea celular, la concentración de los inhibidores que se utilicen, así como de la composición del medio de cultivo [17, 18]. Cuando se cultivan en un medio libre de colesterol, los efectos de la inhibición de la MVD son mayores, provocando inhibición de la proliferación y cambios en el ciclo celular, pero la mayor parte de las células se mantienen viables durante al menos 48 h [17, 19, 20]. Hemos observado que la inhibición de la MVD desencadena la parada (o el retraso) del ciclo celular en la fase S, impidiendo que las células puedan dividirse. En consonancia con la retención en S, las células tratadas con el I1 muestran un tamaño medio mayor que el de las células no tratadas.

Como se ha demostrado anteriormente en nuestro laboratorio, la inhibición de la MVD conlleva la disminución del acervo de dNTPs, lo cual impide la correcta replicación del ADN y conduce a la generación de daño en el ADN. Consecuentemente se activa la vía de ATR/Chk1 y se impide la entrada en mitosis [9]. En el presente trabajo nos centramos en analizar las causas de este desajuste metabólico.

En primer lugar, observamos que la adición de mevalonato no aliviaba los efectos de la inhibición de la MVD, si acaso los agravaba dado que las células se acumulaban en etapas de S más tempranas. Esto está de acuerdo con la observación anterior de que derivados isoprenoides no esteroides (farnesilo y

geranilgeranilo) no prevenían los efectos del fluoromevalonato –un inhibidor de la MVD [9]. Por otra parte, hemos observado que la inhibición de la HMG-CoA reductasa, enzima que cataliza la formación de mevalonato, previene los efectos de la inhibición de la MVD. Efectivamente, las células tratadas con inhibidores de ambas enzimas mostraban un ciclo celular aparentemente normal y se incrementó la proliferación con respecto a las células tratadas únicamente con I1. Estos resultados muestran que para que se visualicen estos efectos de la inhibición de la MVD, al menos a los tiempos relativamente cortos en los que se están estudiando, es necesaria una fuente continua de mevalonato. Como se ha comentado en la Introducción, al impedirse la formación de isopentenil-PP, la inhibición de la MVD conduce a la acumulación de derivados fosforilados del mevalonato [9]. Por lo tanto, era plausible que la causa de aquellos efectos a nivel celular fuera el gasto de ATP que se produce en la fosforilación del mevalonato.

Por ese motivo, decidimos medir la concentración intracelular de ATP. Antes tuvimos que resolver una cuestión metodológica como era el cálculo numérico de dichos datos. En la bibliografía científica, los resultados de concentración de ATP se expresan corregidos tanto por el número de células empleadas como por la concentración de proteína celular. Dado que la inhibición de la MVD determina un incremento en el tamaño medio de las células, decidimos corregir los datos de ATP por la proteína celular, en vez de por célula. Por otra parte, vista la variabilidad del método de bioluminiscencia que se utiliza para la cuantificación del ATP, para combinar los distintos experimentos los resultados se expresaron en % del correspondiente control, como habitualmente se realiza.

Observamos consistentemente en todos los experimentos y series que la interrupción de la ruta de biosíntesis a nivel de la MVD disminuye de forma significativa la concentración de ATP. Este resultado viene a confirmar la hipótesis planteada de que la fosforilación del mevalonato produce un gasto de ATP que no es compensado por la célula, al menos en el intervalo de tiempo estudiado. Este efecto del tratamiento con I1 no se modificaba por el hecho de añadir mevalonato al medio de incubación, lo que puede interpretarse en el sentido de que la capacidad de fosforilar mevalonato ya estaba saturada con tan solo inhibir aquella enzima. Es interesante que, si bien la inhibición de la HMG-CoA reductasa con I2, que reduce la formación de mevalonato, no afecta la concentración de ATP, al combinar I2 con I1 se restablece la concentración de ATP a la normalidad, lo que confirma que el causante del gasto de ATP es el mevalonato. Sin embargo, el mevalonato por sí solo, en ausencia de I1, no altera la concentración de ATP, probablemente porque en el transcurso posterior de la vía se libera el fosfato presente en todos los derivados isoprenoides del mevalonato y puede regenerarse ATP a partir de ADP.

Esta situación recuerda la intolerancia hereditaria a la fructosa debida a la deficiencia de la 1,6-difosfato aldolasa hepática [21], donde ese sustrato se comporta como un sumidero de fosfato ante la imposibilidad de metabolizarse más allá. En esta situación patológica, disminuye la concentración de ATP por el gasto producido en la fosforilación de la fructosa y la imposibilidad de mantenerse la producción de ATP al disminuir la concentración de Pi. Nuestros resultados permiten proponer que, ante una eventual inhibición de la MVD, el mevalonato se comporta como un sumidero de fosfato, con todas sus consecuencias. Esta situación se aliviaría inhibiendo la HMG-CoA reductasa, pero si se realizara de forma continuada, esta actuación podría tener otras consecuencias, como las derivadas de una eventual deficiencia de isoprenoides no esteroides.

El reconocimiento de los llamados sumideros de fosfato plantea un paradigma bioquímico sumamente interesante. Por un lado, el descenso simultáneo de las concentraciones de ATP y de Pi, incrementa la de AMP y estimula la degradación de adenina y, por otro, impide que la producción de ATP, tanto por fosforilación oxidativa como por fosforilación a nivel de sustrato, sea eficaz. En este trabajo hemos estudiado los efectos de la inhibición de la ATP sintasa mitocondrial en este contexto. En condiciones basales, no tratadas con otros agentes, el tratamiento con oligomicina 1 μM durante 22 h produjo un notable descenso de la concentración intracelular de ATP, de alrededor del 40%. En las otras condiciones –presencia de I1 y/o mevalonato– el efecto fue porcentualmente algo superior pero no alcanzó significatividad estadística. Debería profundizarse en este estudio para extraer conclusiones concluyentes. En cualquier caso, la administración de oligomicina dio lugar a una considerable reducción de la viabilidad celular y cambios profundos en el ciclo celular. Esto es debido a que este compuesto bloquea la fracción F_0 de la ATP sintasa, inhibiendo el paso de protones y, por consiguiente, la fosforilación oxidativa. De este modo, la síntesis de ATP mitocondrial queda inhibida y las células reciben un aporte energético considerablemente menor que las células control y mueren. Hay que señalar que las células se incubaron en un medio que contiene una concentración de glucosa de 2 g/L, muy superior a la plasmática, y también contiene otros nutrientes energéticos como glutamina y ácidos grasos, por lo que la contribución de cada una de estas fuentes no es posible establecerla en nuestras condiciones experimentales. De todos modos, los resultados demuestran que la producción mitocondrial de ATP es fundamental para sostener la proliferación en estas células.

Otros autores han demostrado en células tumorales que tanto la transición G_1/S como la G_2/M son sensibles a la disponibilidad de ATP [22, 23, 24]. Los resultados del presente trabajo sugieren que el descenso de la concentración de ATP también afecta la transición a través de la fase S, aunque los mecanismos no se conocen. Tal como se ha comentado antes, la inhibición de la MVD provoca el

descenso de la concentración de dNTPs y la provisión de dNs (precursores de los dNTPs) previene los efectos de esa inhibición en el ciclo celular y la proliferación [9]. Un posible mecanismo sería, entonces, que la falta de ATP condujera al descenso de dNTPs por inactivación de la RNR [13]. Sería interesante conocer si en otras situaciones de deficiencia de ATP también se reduce la disponibilidad de dNTPs que, sin duda, afectarían la replicación del ADN.

Por otra parte, debería estudiarse cómo influye el metabolismo de la glucosa en los efectos de la inhibición de la MVD, habida cuenta de la preferencia de las células tumorales por la utilización de la glucólisis como fuente energética (efecto Warburg) [25]. En células HL-60 se ha demostrado que la inhibición de la glucólisis mediante 2-desoxi-D-glucosa induce la parada rápida del ciclo en G₁ y apoptosis [26]. Sin embargo, las células tratadas con I1 sobrepasan G₁, sobreviven durante al menos 48 h y no experimentan apenas apoptosis, sí necrosis. Estas diferencias en los efectos sobre el ciclo celular de dos agentes que producen un descenso en la concentración de ATP son intrigantes. Señalemos que la fosforilación del mevalonato, a tenor de la localización de las enzimas correspondientes, se produce en los peroxisomas, mientras que la glucosa se fosforila en el citoplasma o bien en la membrana mitocondrial, según la isoforma de la hexoquinasa de que se trate.

Para finalizar, podemos extraer las siguientes conclusiones: La inhibición de la MVD inhibe la proliferación celular al retenerse las células en la fase S del ciclo celular. Este y otros efectos relacionados con la proliferación celular se agravan añadiendo mevalonato al medio de cultivo mientras que se previenen, al menos parcialmente, inhibiendo la síntesis de mevalonato, por lo que la fosforilación del mevalonato junto con el impedimento de su metabolización posterior deben figurar entre las posibles causas de aquellos efectos. Por otra parte, la inhibición de la MVD produce un descenso de la concentración intracelular de ATP, que puede asociarse también a la fosforilación del mevalonato ya que se previene en parte inhibiendo la síntesis de este compuesto. La menor disponibilidad de ATP podría ser la causa de la inhibición de la replicación del ADN observada.

Referencias

1. Csikász-Nagy, A., Battogtokh, D., Chen, K. C., Novák, B. y Tyson, J. J. 2006. Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation. *Biophysical Journal*. 90(12): 4361-4379.
2. Taylor, W. R. y Stark, G. R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 20(15): 1803-1815.
3. Martínez-Botas, J., Suárez, Y., Ferruelo, A. J., Gómez-Coronado, D. y Lasunción, M. A. 1999. Cholesterol starvation decreases P34cdc2 kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *The FASEB Journal*. 13(11): 1359-1370.
4. Fernández, C., Martín, M., Gómez-Coronado, D. y Lasunción, M. A. 2005. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *Journal of lipid research*. 46(5): 920-929.
5. Maxfield, F. R. y Tabas, I. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*. 438(7068): 612-621.
6. Viccica, G., Vignali, E. y Marcocci, C. 2007. Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation. *Journal of Endocrinological Investigation*. 30(6 Suppl): 8-12.
7. Kovacs, W. J., Shackelford, J. E., Tape, K. N., Richards, M. J., Faust, P. L., Fliesler, S. J. y Krisans, S. K. 2004. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. *Molecular and Cellular Biology*. 24(1): 1-13.
8. Fernández, C., María del Val, T. L., Gómez-Coronado, D. y Lasunción, M. A. 2004. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Experimental cell research*. 300(1): 109-120.
9. Martín-Sánchez, C., Pérez-Martín, J. M., Jin, J. S., Dávalos, A., Zhang, W., de la Peña, G., Martínez-Botas, J., Rodríguez-Acebes, S., Suárez, Y., Hazen, M.J., Gómez-Coronado, D., Busto, R., Cheng, Y.C. y Lasunción, M. A. 2015. Disruption of the mevalonate pathway induces dNTP depletion and DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1851(9): 1240-1253.
10. Nave, J. F., d'Orchymont, H., Ducep, J. B., Piriou, F. y Jung, M. J. 1985. Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate. *Biochemical Journal*. 227(1): 247-254.
11. Cuthbert, J. A. y Lipsky, P. E. 1991. Negative regulation of cell proliferation by mevalonate or one of the mevalonate phosphates. *Journal of Biological Chemistry*. 266(27): 17966-17971.
12. Bebenek, K., Roberts, J. D. y Kunkel, T. A. 1992. The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication. *Journal of Biological Chemistry*. 267(6): 3589-3596.

13. Reichard, P. 2010. Ribonucleotide reductases: substrate specificity by allostery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396(1): 19-23.
14. Guarino, E., Salguero, I. y Kearsey, S.E. 2014. Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 30:97-103.
15. Lagergren, J. y Reichard, P. 1987. Purine deoxyribonucleosides counteract effects of hydroxyurea on deoxyribonucleoside triphosphate pools and DNA synthesis. *Biochemical Pharmacology*. 36 (18): 2985-2991.
16. Jakobisiak, M. y Golab, J. 2003. Potential antitumor effects of statins. *International Journal of Oncology*. 23(4): 1055-1069.
17. Cuthbert, J. A. y Lipsky, P. E. 1990. Inhibition by 6-fluoromevalonate demonstrates that mevalonate or one of the mevalonate phosphates is necessary for lymphocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 265(30): 18568-18575.
18. Lasunción, M. A., Martín-Sánchez, C., Canfrán-Duque, A. y Busto, R. 2012. Post-lanosterol biosynthesis of cholesterol and cancer. *Current opinion in pharmacology*. 12(6): 717-723.
19. Raiteri, M., Arnaboldi, L., Mcgeady, P., Gelb, M. H., Verri, D., Tagliabue, C., Quarato, P., Ferraboschi, P., Santaniello, E., Paoletti, R., Fumagalli, R. y Alberto Corsini, A. 1997. Pharmacological control of the mevalonate pathway: effect on arterial smooth muscle cell proliferation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 281(3): 1144-1153.
20. Cuthbert, J. A. y Lipsky, P. E. 1995. Suppression of the proliferation of Ras-transformed cells by fluoromevalonate, an inhibitor of mevalonate metabolism. *Cancer research*. 55(8), 1732-1740.
21. Ali, M., Rellos, P. y Cox, T. M. 1998. Hereditary fructose intolerance. *Journal of medical genetics*. 35(5), 353-365
22. Sweet, S. y Singh, G. 1995. Accumulation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpoints. *Cancer research*. 55(22), 5164-5167
23. Sweet, S. y Singh, G. 1999. Changes in mitochondrial mass, membrane potential, and cellular adenosine triphosphate content during the cell cycle of human leukemic (HL-60) cells. *Journal of cellular physiology*. 180(1): 91-96.
24. Park, Y. Y., Ahn, J. H., Cho, M. G. y Lee, J. H. 2018. ATP depletion during mitotic arrest induces mitotic slippage and APC/CCdh1-dependent cyclin B1 degradation. *Experimental & molecular medicine*. 50(4): 46.
25. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. y Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324(5930): 1029-1033
26. Tomšík, P., Stoklasová, A., Mičuda, S., Niang, M., Šuba, P., Knížek, J. y Řezáčová, M. 2008. Evaluation of the antineoplastic activity of L-rhamnose in vitro. A comparison with 2-deoxyglucose. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 51(2): 113-119.