

Aceite de cáscara de *Citrus reticulata* con potencial terapéuticos para el tratamiento de la aterosclerosis: estudios bioquímicos, moleculares y bioinformáticos.

Castro M. A.¹, Llanos M.A.², Rodenak-kladniew B.¹, Gavernet L.², García de Bravo M.¹ y Crespo R.¹

¹ INIBIOLP (CONICET- CCT La Plata- UNLP), ²Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (Lideb), UNLP.

Introducción: La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular (ECV) caracterizada por un engrosamiento de las paredes arteriales debido al depósito de lípidos principalmente el colesterol (Col) y a una respuesta inflamatoria crónica promovida por macrófagos y células espumosas. Las ECVs son la principal causa de muerte y discapacidad a nivel mundial siendo la hipercolesterolemia el factor que contribuye al 56% de los casos de cardiopatía coronaria. Los niveles de Col plasmático se regulan por mecanismos como la síntesis *de novo* del Col o vía del mevalonato (VM) principalmente activa en hepatocitos. En las primeras etapas de la VM (reacciones pre-escualeno) se generan isoprenoides no esteroideos como ubiquinona, dolicol y grupos prenilos. La enzima lanosterol sintasa (LSS) es quien cataliza la reacción de ciclación del escualeno para formar lanosterol que es el primer componente cíclico de la VM del cual derivan todos los esteroides. La inhibición de la LSS representa un blanco terapéutico muy prometedor como agente hipocolesterolemizante debido a que interviene en una reacción post-escualeno lo que implicaría inhibir la síntesis de Col sin afectar la de moléculas no esteroideas. Por otro lado, los macrófagos participan activamente en la formación de la lesión aterosclerótica a través de la interacción de sus receptores scavenger CD36 con LDL oxidadas. El aceite de cáscara de mandarina (ACM) *Citrus reticulata* está constituido por compuestos naturales (GRAS), con potencial actividad hipocolesterolemizante y antiaterogénica.

Objetivo general: Evaluar el efecto del ACM sobre el metabolismo lipídico en líneas celulares hepáticas y macrófagos, así como el efecto antioxidante sobre LDLs para encontrar nuevos blancos terapéuticos antiaterogénicos de baja toxicidad.

Métodos: Se utilizaron concentraciones de 0-100 $\mu\text{L/L}$ de ACM y su componente mayoritario el limoneno (Li) en células HepG2 y Raw 264.7. Las HepG2 fueron incubadas las últimas 3 hs de tratamiento con ^{14}C -acetato. Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch, separados e identificados por TLC, cuantificados en contador de radiactividad y analizados en equipo Storm. Las Raw 264.7 se diferenciaron de macrófagos a células espumosas incubando 8 hs con LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$). El contenido lipídico teñido con Oil-Red-Oil se analizó por microscopía y espectrofotometría. La expresión del receptor CD36 se cuantificó por RT-qPCR. Los componentes del ACM fueron sometidos a simulaciones de docking molecular para proponer un modo de interacción con la LSS utilizando una estructura cristalográfica obtenida del Protein Data Bank. La metodología se validó con el estudio de inhibidores reportados. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de los candidatos en el sitio de unión.

Resultados: Se observó que concentraciones menores a 60 $\mu\text{L/L}$ del ACM y Li en las células hepáticas inhiben la síntesis de Col pero incrementan los niveles de incorporación de ^{14}C -acetato en productos de reacciones pre-escualeno como la ubiquinona y escualeno. En células espumosas disminuyen los depósitos de lípidos intracelulares y la expresión de receptores CD36. Mayores concentraciones del ACM mostraron una disminución en la

incorporación del ^{14}C -acetato en Col y en todos los intermediarios de la VM detectados, así como en distintos glicerolípidos neutros y polares. Los depósitos de lípidos en las células espumosas disminuyeron significativamente. Las simulaciones computacionales muestran que el Li y algunos componentes minoritarios del ACM podrían interactuar con la LSS en una región cercana al sitio catalítico.

Conclusiones: El ACM disminuye la síntesis de Col y los depósitos de lípidos intracelulares sugiriendo una inhibición de la enzima LSS, lo que se complementa con las simulaciones computacionales. Estos resultados constituyen evidencias muy alentadoras para avanzar con la validación del ACM como inhibidor de la LSS, potencial blanco terapéutico para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis.

Sesión correspondiente: Lípidos en la Nutrición