

Efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol y la proliferación en células humanas

C. Fernández^a, M. Martín^a, D. Gómez-Coronado^a y M.A. Lasunción^{a,b}

^aServicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid. España.

Introducción y objetivos. Se sabe que el consumo de fitosteroles reduce la concentración de colesterol en plasma, debido a la interferencia de estos compuestos en la absorción intestinal de colesterol. Aunque en pequeña proporción, los fitosteroles de la dieta también se asimilan, y su concentración en el plasma es mil veces inferior a la del colesterol. Dada su analogía estructural con el colesterol, nos planteamos determinar el efecto de distintos fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol en células humanas y su repercusión sobre la proliferación celular.

Método. Las células de la línea promielocítica humana HL-60 se cultivaron en un medio libre de colesterol (DCCM-1) en presencia de los diferentes esteroides en estudio y de [¹⁴C]-acetato como precursor para la biosíntesis de colesterol. Al cabo de 8 h de incubación se lisaron las células y se extrajeron los lípidos no saponificables, que posteriormente fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La proliferación celular se analizó determinando la incorporación de [³H]-timidina al ADN y por recuento de las células.

Resultados. Los fitosteroles insaturados en el C22 de la cadena lateral –estigmasterol, brasicasterol y ergosterol– inhibieron la biosíntesis de colesterol en células HL-60 en concentraciones fisiológicas, de 1 µg/ml, mientras que los otros fitosteroles –β-sitosterol y campesterol– fueron inactivos incluso en concentraciones de 30 µg/ml.

El 5,22-colestadien-3β-ol, un esteroide no natural que contiene también un doble enlace en C22, inhibió la incorporación de [¹⁴C]-acetato a colesterol mucho más intensamente que los anteriores. El descenso de ¹⁴C-colesterol se acompañó de un aumento de la radiactividad en desmosterol y también, aunque menos intensamente, en 5,7,24-colestatrien-3β-ol. A pesar de estos cambios en la composición celular de esteroides, los fitosteroles no afectaron la viabilidad ni la proliferación de las células HL-60, lo que sugiere que los esteroides intermediarios pueden suplir al colesterol en sus funciones en la división celular.

Conclusiones. Los fitosteroles con doble enlace en C22 inhiben la biosíntesis de colesterol a valor de la esteroide Δ²⁴-reductasa en concentraciones que pueden considerarse fisiológicas, por lo que esta acción puede considerarse un mecanismo adicional para explicar los efectos hipolipemiantes de estos compuestos.

Palabras clave:

Biosíntesis de colesterol. Desmosterol. Fitosteroles. Proliferación celular. HL-60.

EFFECT OF PHYTOSTEROLS ON CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS AND HUMAN CELL PROLIFERATION

Introduction. Dietary phytosterols reduce plasma cholesterol levels by interfering with cholesterol absorption in the intestine. Phytosterols are also absorbed, although to a lesser extent, and their concentration in plasma is one thousand-fold lower than that of cholesterol. Due to their structural similarities with cholesterol, in the present study we sought to determine the effects of different phytosterols on cholesterol biosynthesis in human cells, as well as their effects on cell proliferation.

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a las ayudas de investigación del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 99/0286) y del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA VIN00/004).

Correspondencia: Miguel A. Lasunción.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de Alcalá. 28771 Alcalá de Henares. Madrid. España.
Correo electrónico: miguel.a.lasuncion@hrc.es

Method. Human promyelocytic cell line HL-60 was cultured in a cholesterol-free medium (DCCM-1) in the presence of the sterols under study and [^{14}C]-acetate as precursor for cholesterol biosynthesis. After incubation for 8 hours, the cells were lysed and non-saponifiable lipids were extracted and subsequently analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Cell proliferation was determined by [^3H]-thymidine incorporation into DNA and cell counting.

Results. In HL-60 cells, C22-unsaturated phytosterols (stigmasterol, brassicasterol and ergosterol) inhibited cholesterol biosynthesis at physiological concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$, whereas the other phytosterols analyzed (β -sitosterol and campesterol) were inactive, even at concentrations of 30 $\mu\text{g/ml}$. The non-natural sterol, 5,22-cholestadien-3 β -ol, which also contains a double bond at C22, inhibited ^{14}C -acetate incorporation into cholesterol much more intensely. The decrease in ^{14}C -cholesterol was accompanied by an increase in radioactivity incorporation into desmosterol and, less markedly, in 5,7,24-cholestatrien-3 β -ol. Despite these changes in the cellular composition of sterols, phytosterols did not affect cell viability or growth, suggesting that these cholesterol precursors may substitute for cholesterol in cell proliferation.

Conclusions. Phytosterols with a double bond at C22-23 in the lateral chain block cholesterol biosynthesis in human cells by inhibiting sterol Δ^{24} -reductase. This effect is reached at concentrations found physiologically in plasma. Therefore, it can be considered as an additional mechanism for the hypolipidemic effect of these compounds.

Key words:

Cholesterol biosynthesis. Desmosterol. Phytosterols. Cell proliferation. HL-60.

Introducción

Los fitosteroles cumplen en los vegetales funciones análogas a las del colesterol en los animales. Presentan una estructura muy similar al colesterol, pero con pequeñas variaciones, como la adición de algún grupo alquilo (metilo o etilo) en posición C24 y, menos frecuentemente, una insaturación en C22 (fig. 1). Las fuentes más comunes de fitosteroles son los aceites vegetales, frutos secos y frutas, principalmente. Los fitosteroles mayoritarios son β -sitosterol y campesterol, en este orden, que constituyen aproximadamente el 95% del total de estos compuestos. El otro 5% corresponde a los fitosteroles insatura-

dos en su cadena lateral, como el estigmasterol¹, pero, obviamente, estas proporciones varían entre los alimentos. El consumo de estos compuestos es muy variable. En los países occidentales suele ser relativamente bajo, menor de 100 mg/día, mientras que en los países orientales y con dietas vegetarianas suele estar por encima de los 400 mg/día². El consumo de fitosteroles en España no se ha determinado con exactitud.

En condiciones normales la absorción intestinal de los fitosteroles es muy limitada, menos de un 5% de la ingesta total³. Una vez en la sangre, son rápidamente eliminados y su concentración raramente excede 1 mg/dl⁴. La baja absorción intestinal de estos compuestos se atribuye a las proteínas ABCG5 y ABCG8 presentes en la mucosa intestinal y en los hepatocitos, que actúan bombeando esteroides hacia la luz intestinal y los canalículos biliares, respectivamente⁵. Mutaciones en estas proteínas producen la sitosterolemia⁶, una enfermedad caracterizada por una marcada hiperabsorción de estos compuestos y de colesterol. Los pacientes con esta enfermedad presentan concentraciones de fitosteroles en plasma muy elevadas, y las de colesterol son también ligeramente superiores a las normales. Estos pacientes presentan una clínica muy característica, con concentraciones de bilirrubina en plasma elevadas debido a un aumento en la hemólisis producida por el incremento de la rigidez de la membrana de los eritrocitos, así como xantomatosis y enfermedad arteriosclerótica prematura⁷.

Los estudios epidemiológicos muestran que el consumo de fitosteroles es un factor preventivo del cáncer de colon⁸ y reduce la prevalencia de enfermedades cardiovasculares⁹. En cuanto a sus acciones, se conoce que en el tracto intestinal los fitosteroles desplazan al colesterol de las micelas y, consecuentemente, disminuyen su absorción intestinal^{10,11}. Este hecho, junto con la estimulación de la expresión de las proteínas ABCG anteriormente mencionadas, produce una reducción de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) en plasma, que oscila entre el 10 y el 15%, dependiendo de la ingesta de estos compuestos^{10,11}.

La biosíntesis de colesterol a partir del acetil-CoA se realiza en varias etapas, donde, además del producto final (fig. 2), se sintetizan otros compuestos tanto de naturaleza esteroídica como no esteroídica, de crucial importancia para la fisiología celular. La primera de estas etapas es la síntesis de mevalonato, un compuesto de seis carbonos, en la que intervienen tres enzimas; la más notable es la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que es inhibida de manera competitiva por las estatinas. La

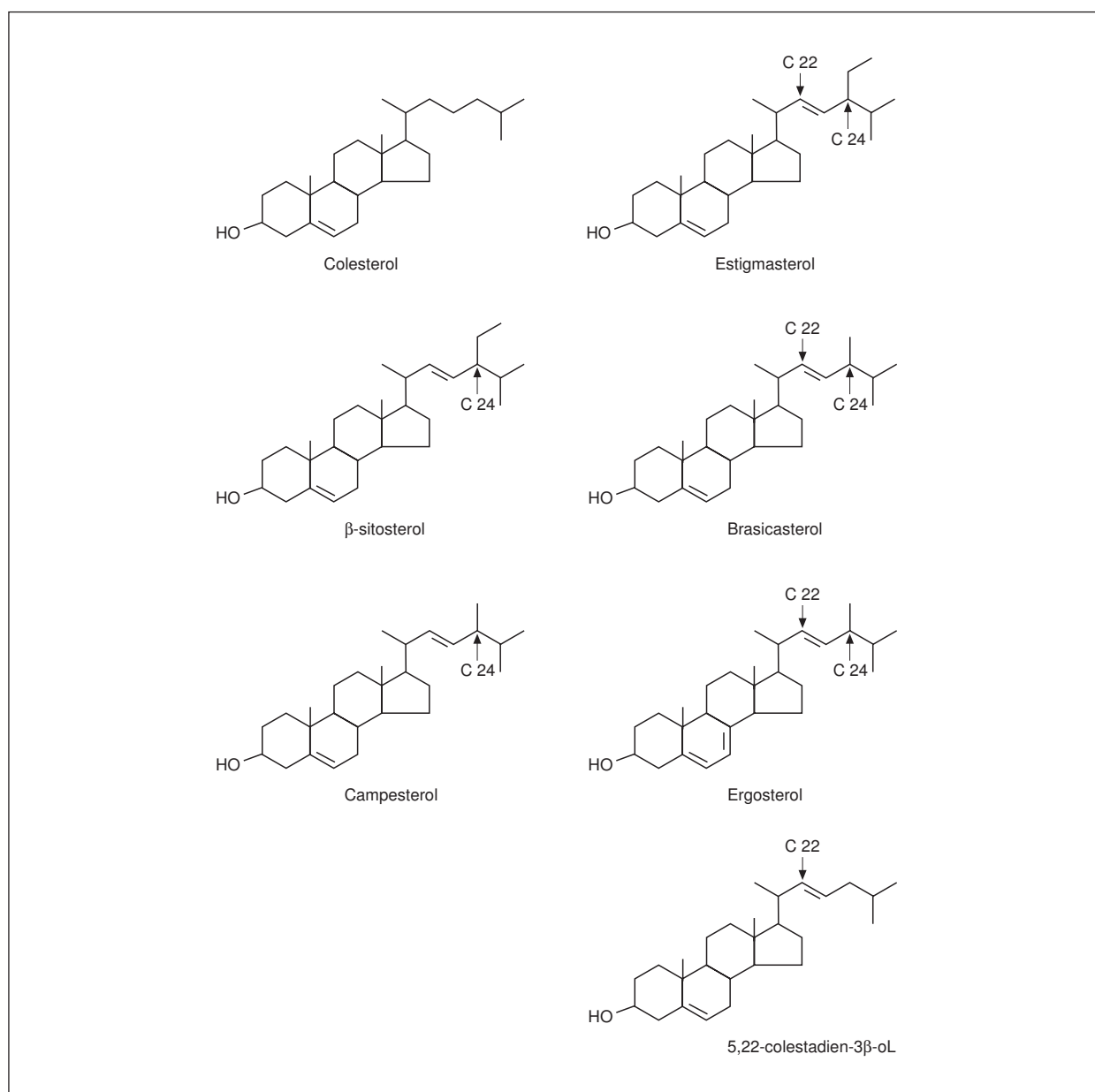


Figura 1. Estructuras del colesterol, del β -sitosterol y del campesterol (fitosteroles saturados en la cadena lateral), del stigmasterol, del ergosterol y del brassicasterol (fitosteroles insaturados en la cadena lateral), y del 5,22-colestadien-3 β -ol.

siguiente etapa conduce a la formación de isoprenoides por la descarboxilación del mevalonato pirofosfato. Las unidades isoprenoides pueden ser consideradas como bloques de construcción del esqueleto esteroide. Seis de estas unidades se condensan para formar un intermediario, el escualeno, el cual da origen al esteroide progenitor, el lanosterol, por acción de la enzima escualeno ciclasa. El colesterol se forma a partir del lanosterol a través de numerosas reacciones, entre las que se incluye la reducción del doble

enlace en la posición 24 de la cadena lateral, reacción catalizada por la esteroide Δ^{24} reductasa. Esta enzima, que ha sido recientemente clonada¹², puede actuar sobre cualquier sustrato esteroídico que presente doble enlace entre los carbonos C24-25, por lo que también es conocida como lanosterol reductasa o desmosterol reductasa, dependiendo del esteroide utilizado como sustrato. En cuanto a la especificidad, la enzima muestra la mayor afinidad por el 5 α -colestano-7,24-3 β -ol, seguido de zimosterol, desmos-

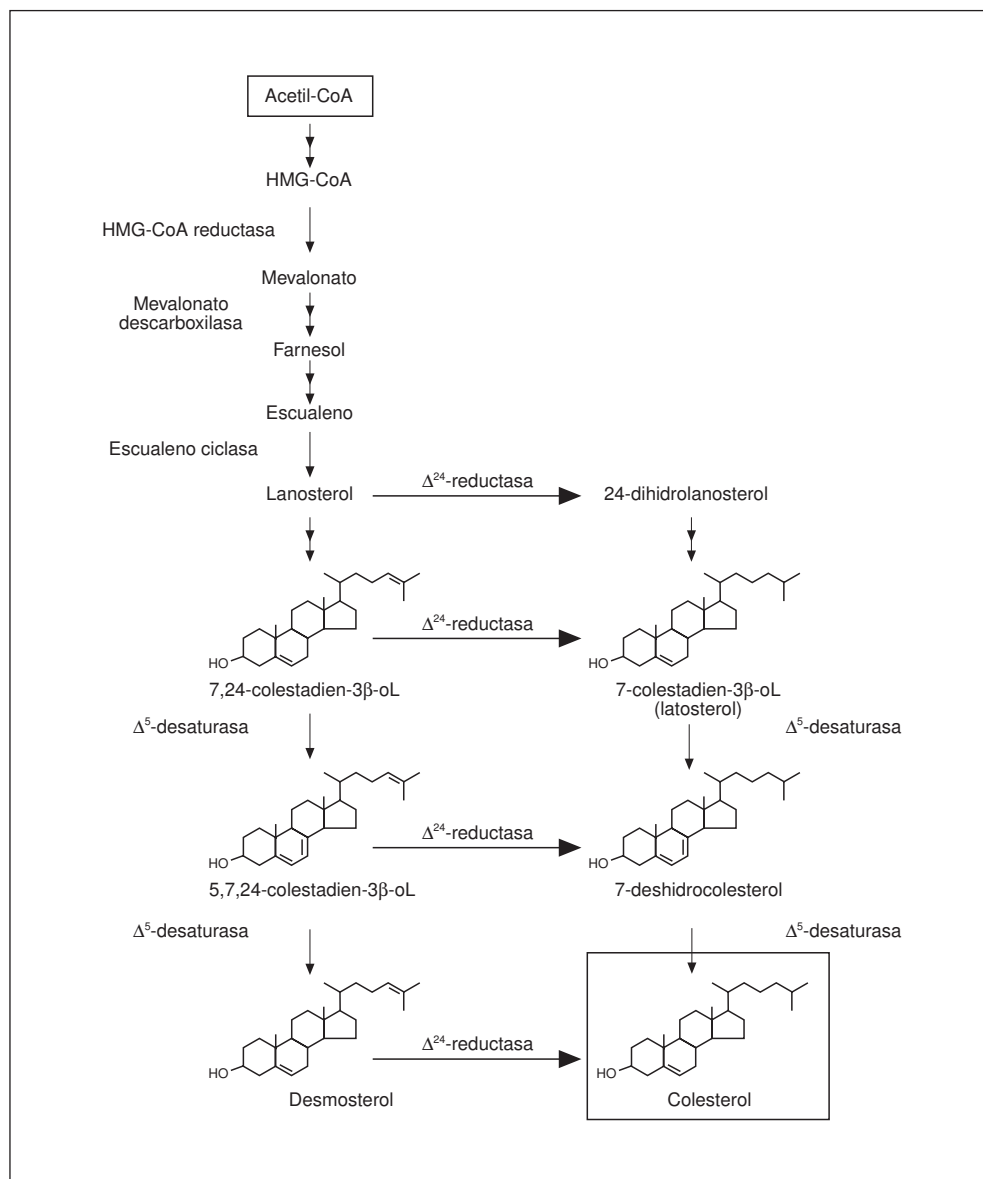


Figura 2. Esquema de las reacciones de interés de la ruta de biosíntesis del colesterol.

terol y lanosterol¹³. La esterol Δ^{24} reductasa sólo es capaz de reducir el doble enlace en posición C24-25, y no en C22-23¹⁴. De hecho, en células animales no se ha caracterizado ninguna actividad Δ^{22} reductasa.

El colesterol es esencial para la proliferación de las células de mamíferos. Así, la inhibición de la biosíntesis de colesterol en células incubadas en un medio deficiente de colesterol conduce a una disminución de la tasa de proliferación¹⁵⁻¹⁷. Nosotros hemos demostrado en células HL-60 que la inhibición de lanosterol 14 α -desmetilasa, que provoca un descenso de la concentración intracelular de colesterol mientras que aumenta el lanosterol, conduce a la parada del ciclo celular en G2/M¹⁷. Este efecto

se neutraliza añadiendo colesterol al medio de cultivo, lo que demuestra su especificidad^{17,18}. Queda por comprobar si otros esteroides pueden suplir o complementar al colesterol en esta acción.

Recientemente hemos demostrado que los fitosteroides con doble enlace en C22 se comportan como inhibidores competitivos de la esterol Δ^{24} reductasa en microsomas de hígado de rata, mientras que los fitosteroides saturados son inactivos a este respecto¹⁹. En el presente trabajo hemos pretendido determinar si esta acción sobre la biosíntesis de colesterol tiene alguna repercusión en la proliferación celular. En primer lugar, hemos comprobado que la incubación de células HL-60 en presencia de fitosteroides

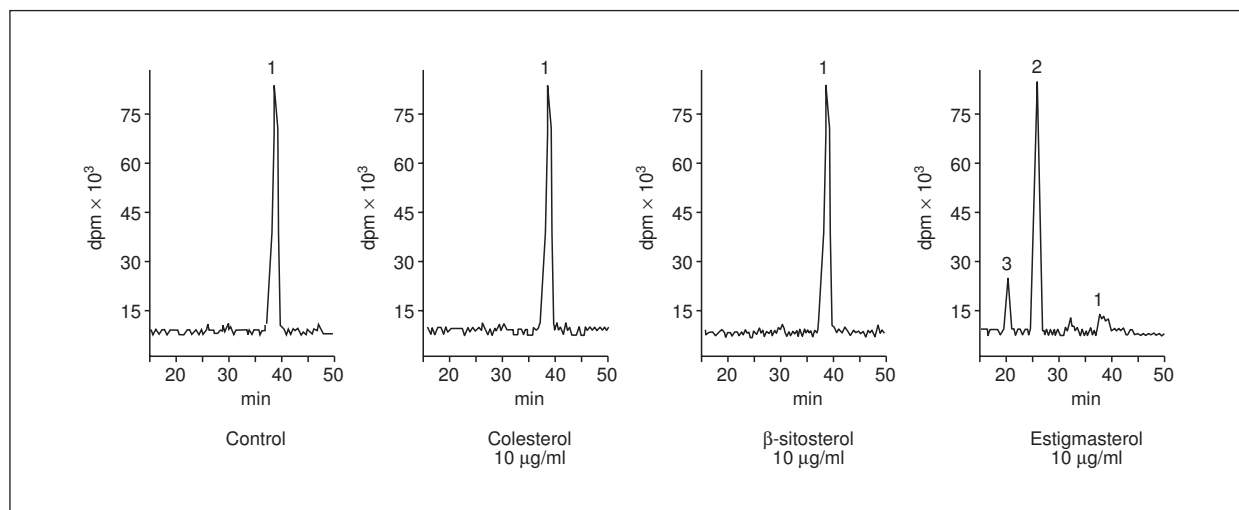


Figura 3. Análisis de los esteroides marcados metabólicamente en células tratadas con diferentes esteroides. Las células HL-60 se incubaron con [^{14}C]-acetato en ausencia (control) o en presencia de diferentes esteroides (colesterol, β -sitosterol y estigmasterol) en dosis de 10 mg/ml. Al final de las 8 h de incubación, las células se lisaron con KOH al 10% y se extrajeron los lípidos no saponificables con cloroformo-metanol (2:1) y hexano. Finalmente, los esteroides se separaron mediante HPLC en fase reversa y recuento de la radiactividad en serie. Picos identificados: 1, colesterol; 2, desmosterol; 3, 5,7,24-colestatrien-3 β -ol.

insaturados en C22-23 produce un rápido descenso de la incorporación de [^{14}C]-acetato a colesterol, con la acumulación de desmosterol. Pues bien, y a pesar de ello, las células HL-60 incubadas en presencia de esos fitosteroides no vieron alterada su tasa de proliferación, al menos durante las primeras 72 h de cultivo. Por lo tanto, estos fitosteroides, o bien los esteroides intermediarios de la síntesis de colesterol acumulados por efecto de la inhibición de la esteroide Δ^{24} reductasa, pueden complementar al colesterol en la proliferación celular.

Materiales y métodos

Materiales

Las células HL-60 (línea promielocítica humana) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). El medio libre de colesterol DCCM-1 fue obtenido de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel), y los antibióticos procedían de Gibco BRL (Barcelona, España). El colesterol y el β -sitosterol se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), y el resto de los esteroides (desmosterol, estigmasterol, brasicasterol, ergosterol y 5,22-colestadien-3 β -ol), a Steraloids, Inc. (Newport, RI). [^{14}C]-acetato (53 mCi/mmol) y [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$]-colesterol (45,6 Ci/mmol) se obtuvieron de Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH (Barcelona, España). Los otros compuestos utilizados fueron de grado analítico.

Cultivos celulares

Las células HL-60 se mantuvieron en medio DCCM-1 suplementado con antibióticos (100 U penicilina/ml, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina) en un incubador a 37 $^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . Los esteroides se resuspendieron en etanol y fueron añadidos al cultivo celular a

una concentración máxima de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (concentración final de etanol 0,44%), debido a razones de citotoxicidad y solubilidad de los diferentes esteroides.

Marcaje metabólico y análisis de los diferentes intermediarios de la biosíntesis de colesterol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las células HL-60 ($7,5 \times 10^6$) se preincubaron durante 2 h en 10 ml de medio DCCM-1 que contenía los esteroides en estudio, posteriormente se añadieron 40 μCi de [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-acetato y la incubación se prolongó durante 8 h más. Una vez finalizada la incubación, se separaron las células mediante centrifugación, se lavaron dos veces con PBS y fueron finalmente resuspendidas en KOH al 10%. Como estándar interno se añadió [$1\alpha,2\alpha(n)^3\text{H}$]-colesterol. Las muestras fueron tratadas secuencialmente con cloroformo/metanol (2:1) y agua destilada para obtener la fracción lipídica y la fracción soluble²⁰. Posteriormente se extrajeron los lípidos no saponificables con hexano. El porcentaje de recuperación del [^3H]-colesterol fue siempre superior al 60% ($64,9 \pm 0,7\%$, media \pm desviación estándar[DE]). La fracción que contenía los lípidos no saponificables se inyectó en un equipo de HPLC (Beckman Instruments, Palo Alto, CA; modelo 168). La separación se realizó con una columna de fase reversa Luna 5 μm C18 (250 \times 4,60 mm, Phenomenex, Torrance, CA). Los lípidos fueron eluidos con acetonitrilo-agua (95:5) durante los primeros 37 min y seguidamente con metanol absoluto, a un flujo de 1,2 ml/min. Se monitorizó la absorbancia en UV (detector de diodos Beckman 168) y la radiactividad (LB-506 C-1, Berthold, Bad Wildbad, Alemania)¹⁹. Los esteroides fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y el espectro de absorción de estándares puros.

Ensayo de proliferación celular

Para la medida de la proliferación celular, se cultivaron 15.000 células en 225 μl en placas de 96 pocillos (Multiscreen-HV). En los diferentes tiempos de ensayo (24, 48 y 72 h), cada

Tabla 1. Incorporación de [¹⁴C]-acetato a colesterol y otros intermediarios de su biosíntesis en células HL-60 tratadas con diferentes esteroides

	Dosis (µg/ml)	¹⁴ C-colesterol (%)	¹⁴ C-desmosterol (%)	¹⁴ C-5,7,24-colestatrienol (%)
Sitosterol	1	100	–	–
	10	100	–	–
	30	100	–	–
Campesterol	1	100	–	–
	10	100	–	–
	30	100	–	–
Ergosterol	1	52,5	47,5	–
	10	6,25	77,78	15,96
	30	5,70	60,05	34,24
Estigmasterol	1	77,31	16,04	6,65
	10	27,39	53,72	18,01
	30	11,44	60,23	28,32
Brasicasterol	1	72,13	27,97	–
	10	17,36	75,94	6,69
	30	16,45	70,07	13,46
5,22-Colestadien-3β-ol	1	19,73	66,86	13,40
	10	12,76	70,43	16,81

pocillo se suplementó con 5-fluorodeoxiuridina a una concentración final de 10 mM, durante 1 h, y posteriormente se añadieron 0,5 µC de [³H]-timidina; después de 18 h de incubación las células fueron procesadas y se cuantificó la radiactividad incorporada al ADN²¹. Por otro lado, el recuento de las células se realizó con un hemocitómetro, utilizando azul tripano como tinción vital.

Resultados

Para analizar el efecto de los fitosteroides sobre la colesterogénesis, en primer lugar se determinó la incorporación de [¹⁴C]-acetato a los diferentes esteroides en las células de la línea HL-60, una línea celular promielocítica humana que presenta una alta tasa de biosíntesis de colesterol en correspondencia con su elevada tasa de proliferación. Los esteroides estudiados fueron: β-sitosterol y campesterol, como fitosteroides mayoritarios en los vegetales y representantes de los que poseen la cadena lateral saturada y, por otro lado, los insaturados en C22, estigmasterol y brasicasterol, así como ergosterol –esterol de las levaduras y hongos– y 5,22-colestadien-3β-ol, un esteroide no natural (fig. 1). Los resultados se compararon con los ejercidos por el colesterol. En la figura 3 se muestran los perfiles obtenidos tras la separación de los esteroides mediante HPLC y análisis de la radiactividad en células incubadas en condiciones control, así como en presencia de una concentración de colesterol, sitosterol o estigmasterol, como representantes de los distintos tipos de esteroides estudiados. En la tabla 1 se detallan los resultados para cada uno de los esteroides estudiados, a diferentes concentraciones, señalándose los porcentajes de distribución de la radiactividad en los tres esteroides sintetizados más significativos: colesterol, producto fi-

nal, y desmosterol y 5,7,24-colestatrien-3β-ol, precursores inmediatos del colesterol (fig. 2). Como se observa, el perfil de radiactividad en condiciones controles mostró un solo pico, correspondiente al colesterol (fig. 3). La incubación de las células en presencia de colesterol no afectó el perfil de radiactividad; únicamente a concentraciones más altas este esteroide (60 µg/ml), la biosíntesis de colesterol se redujo de forma significativa (datos no mostrados), como cabía esperar por la consabida retrorregulación de la vía por el producto final. Al igual que el colesterol, los análogos saturados β-sitosterol y campesterol no alteraron el patrón de incorporación de acetato a los esteroides de la ruta de la colesterogénesis (fig. 3 y tabla 1). Por el contrario, cuando las células se incubaron con esteroides insaturados en la cadena lateral, el perfil varió sustancialmente. Así, el estigmasterol (fig. 3), el brasicasterol, el ergosterol y el 5,22-colestadien-3β-ol (tabla 1) produjeron el descenso de la radiactividad en colesterol, aumentando ésta en los mencionados precursores, especialmente desmosterol, de una manera dependiente de la dosis. El compuesto 5,22-colestadien-3β-ol inhibió la incorporación de acetato mucho más intensamente que los otros, con un valor de IC₅₀ inferior a 0,1 µg/ml, aproximadamente. Este esteroide fue altamente citotóxico, y las células murieron cuando se expusieron a concentraciones superiores a 10 µg/ml. La acumulación de desmosterol y de 5,7,24-colestatrien-3β-ol por efecto de estos esteroides sugería la inhibición de la enzima esteroide Δ²⁴ reductasa.

Una vez determinado el efecto de estos esteroides sobre la biosíntesis de colesterol, quisimos analizar su repercusión sobre la proliferación celular. Como

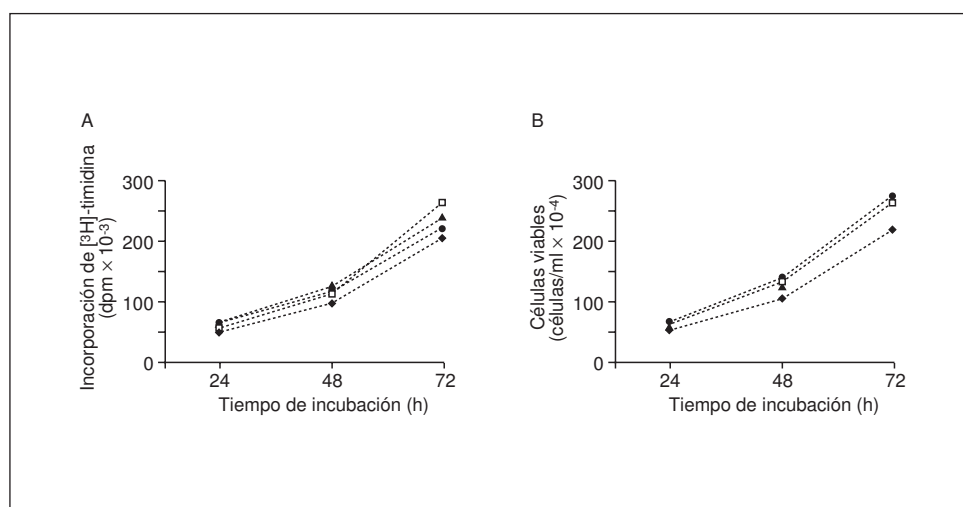


Figura 4. Proliferación de las células HL-60 incubadas en ausencia (control) o en presencia de diferentes esteroides (10 µg/ml). A) Tasa de incorporación de [3H]-timidina al ADN: control (▲); colesterol (□); estigmasterol (●); β-sitosterol (◆). B) Número de células viables: control (▲); colesterol (□); estigmasterol (●); β-sitosterol (◆).

se muestra en la figura 4, la incubación de las células HL-60 en presencia de estigmasterol o de β-sitosterol, como representantes de los fitosteroles insaturados y saturados en C22 respectivamente, no afectó la incorporación de [3H]-timidina al ADN en comparación con el colesterol. Estos datos se confirmaron por recuento directo de las células (fig. 4B). Habida cuenta de que los fitosteroles insaturados en la cadena lateral disminuyen significativamente la concentración de colesterol, a la vez que aumentan la de desmosterol (fig. 3 y tabla 1), aquellos resultados sugieren que el desmosterol puede suplir o complementar al colesterol restante en la célula en su acción sobre la proliferación celular.

Discusión

Desde los estudios pioneros de Peterson realizados en pollos²², el interés por utilizar fitosteroles como agentes hipolipemiantes se incrementó notablemente, y en la actualidad se dispone de multitud de resultados obtenidos en humanos que demuestran la utilidad del consumo de estos compuestos para rebajar las concentraciones de colesterol en plasma²³. El mecanismo que conduce a este descenso está mediado por una disminución de la absorción intestinal de colesterol, como resultado de la interferencia de la incorporación del colesterol a las micelas^{10,11}, aunque también puede contribuir a ello la estimulación de la excreción intestinal de colesterol, tal como ha sido recientemente propuesto²⁴. La modificación de la dieta para incrementar el consumo de fitosteroles se estima que podría reducir las concentraciones de cLDL en un 10-15%, sin afectarse las de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) ni las de triglicéridos²³. La inclusión en la dieta de alimentos su-

plementados con esteroides vegetales se considera una alternativa para controlar la hipercolesterolemia²⁵⁻²⁷.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol y su repercusión en la proliferación celular. Resultados de otros autores indicaban que ciertos fitosteroles inhibían la HMG-CoA reductasa²⁸, probablemente a valor de la transcripción por su analogía estructural con el colesterol, pero la interconversión de esteroides, dentro de la ruta de la colesterogénesis, no había sido estudiada. Esta última parte de la biosíntesis de colesterol, desde el lanosterol en adelante, implica la participación de numerosas enzimas de reciente caracterización a valor genético, que catalizan pequeños cambios en los anillos del esteroide, así como la saturación de la cadena lateral. La naturaleza esteroídica de los fitosteroles permitía plantearse la posibilidad de que estos compuestos interfirieran en la acción de alguna de esas enzimas. Con esta hipótesis se estudió el efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol en células humanas, prestando especial atención a la interconversión de esteroides. Observamos que los fitosteroles con cadena lateral saturada, β-sitosterol y campesterol que, por otra parte, son mayoritarios en los alimentos vegetales, no afectaban la incorporación de acetato radiactivo a colesterol a las dosis empleadas. Sin embargo, los fitosteroles con doble enlace en C22 inhibían intensamente la esterol Δ²⁴ reductasa, reduciendo la síntesis de colesterol y favoreciendo la acumulación de desmosterol y otros esteroides precursores con cadena lateral insaturada en C24. Hay que destacar que estos efectos se producen con concentraciones de fitosteroles perfectamente alcanzables en el plasma, del orden de 1 µg/ml, por lo que

pueden tener relevancia fisiológica. Es más, estas acciones no se limitan a células leucocitarias sino que se observan también en células CaCo-2 de origen intestinal¹⁹, lo que indica que se trata de un efecto general en el organismo.

La acumulación de desmosterol y de 5,7,24-colestatrien-3 β -ol en las células HL-60 tratadas con los fitosteroles insaturados en C22 indicaba la inhibición de la conversión de aquellos esteroides a sus respectivos derivados saturados en C24. Esto coincide con la inhibición de tipo competitivo que ejercen dichos esteroides sobre la esterol Δ^{24} reductasa, como hemos demostrado recientemente¹⁹. En efecto, utilizando microsomas de hígado de rata como fuente de esa enzima, observamos que el estigmasterol, el brasicasterol y el ergosterol inhibían la conversión del desmosterol en colesterol de forma competitiva¹⁹. Las K_i halladas fueron del orden de 40 μ M, valor muy próximo al de la K_m para el sustrato de la reacción, lo que indica que las afinidades de todos estos compuestos por la esterol Δ^{24} reductasa son parecidas entre sí¹⁹. La K_i para el 5,22-colestadien-3 β -ol, esteroide no natural y estructuralmente isómero del desmosterol, fue un orden de magnitud inferior respecto de los anteriores ($3,34 \pm 0,76 \mu$ M)¹⁹, lo que se corresponde con la más intensa inhibición de la biosíntesis de colesterol que se observa en el presente trabajo. En conjunto, estos resultados muestran que los esteroides con doble enlace en C22-23 actúan como inhibidores competitivos de la esterol Δ^{24} reductasa y, por otra parte, que la presencia de otros grupos en la cadena lateral, como los radicales alquilo en C24 que contienen los fitosteroles, afectan la interacción de estos con la enzima.

La esterol Δ^{24} reductasa cataliza la reducción del doble enlace de la posición C24 de los diferentes intermediarios esteroídicos de la biosíntesis de colesterol (fig. 2). La afinidad, no obstante, varía de unos esteroides a otros, y se ha sugerido que en condiciones fisiológicas esta reducción se produce preferentemente después de la isomerización del doble enlace en posición C8 del zimosterol¹³. La aparición, en nuestro caso, de 5,7,24-colestatrien-3 β -ol en células tratadas con fitosteroles con doble enlace en C22 hacía pensar que estos compuestos también podrían afectar la actividad de la enzima esterol Δ^7 reductasa. De hecho, Shefer et al²⁹ habían mostrado que el ergosterol era capaz de inhibir competitivamente, siquiera débilmente, dicha enzima. No obstante, el grupo de Koroly y Dempsey¹⁴ observaron en preparaciones microsomales que la insaturación en posición C22 de la cadena lateral de los esteroides no afectaba las propiedades cinéticas de la esterol Δ^7 re-

ductasa. En relación con otras enzimas de la conversión de esteroides, nosotros comprobamos que en presencia de BM 15766 –un potente y específico inhibidor de la esterol Δ^7 reductasa– los fitosteroles insaturados no afectaban el perfil de radiactividad en las células¹⁹, lo que demuestra que estos compuestos no modifican la actividad de las enzimas anteriores a la esterol Δ^7 reductasa. Dicho sea con la salvedad de la HMG-CoA reductasa. Ciertamente, algunos autores han publicado que tanto el β -sitosterol como el estigmasterol inhiben la expresión de esta enzima en células CaCo-2²⁸, pero dicho extremo no ha podido ser confirmado en fibroblastos³⁰.

Dada la importancia del colesterol en la proliferación de las células de mamíferos, quisimos determinar si los fitosteroles afectaban este proceso en células promielocíticas humanas HL-60. Hemos comprobado que, a la concentración de 10 μ g/ml, ninguno de ellos, tanto si eran saturados como si eran insaturados en C22, comprometía la viabilidad de aquellas células ni alteraba su tasa de proliferación. El hecho de que las células tratadas con fitosteroles insaturados tengan disminuida su disponibilidad de colesterol, mientras acumulan intermediarios, permite proponer que esos otros esteroides, por ejemplo el desmosterol, pueden suplir al colesterol en sus acciones sobre la proliferación celular, al menos en parte. La confirmación definitiva de tal posibilidad, sin embargo, requiere estudios más directos en células deficientes de colesterol. Por otra parte, los propios fitosteroles podrían contribuir al crecimiento celular, especialmente en presencia de pequeñas cantidades de colesterol, como hemos demostrado para el caso del ergosterol¹⁸.

Los resultados del presente estudio amplían el conocimiento sobre los efectos de los fitosteroles en nuestro organismo. Su acción sobre la asimilación del colesterol de la dieta, que ejercen todos ellos de forma genérica, tiene interés terapéutico. De hecho, existen en el mercado margarinas enriquecidas con fitosteroles que reducen eficientemente la colesterolemia. Generalmente estas margarinas contienen β -sitosterol, el esteroide más abundante en la naturaleza, o bien su derivado saturado en el anillo B, el sitostanol. A esta acción debemos sumar también la inhibición de la biosíntesis de colesterol a valor de la esterol Δ^{24} reductasa que producen los fitosteroles insaturados en C22. Estos últimos fitosteroles ciertamente son minoritarios en la naturaleza; entre ellos, el más abundante es el estigmasterol, que está presente principalmente en la lechuga, en algunos frutos secos y en el aceite de girasol. La absorción intestinal del estigmasterol se ha calculado que es del

2-5% del total consumido, tanto en humanos como en animales de experimentación^{3,31,32}. Su concentración en el plasma en individuos sanos es muy variable (de 0,2 a 5 µg/ml) y depende fundamentalmente del tipo de alimentación que se siga. Habida cuenta de que el estigmasterol es capaz de inhibir la síntesis de colesterol a dosis de 1 µg/ml, este fitosterol podría ser considerado como un modulador de la síntesis de colesterol en condiciones fisiológicas. En pacientes con sitosterolemia, donde la concentración de fitosteroles en plasma es 100 veces superior a la normal, los fitosteroles insaturados podrían contribuir de manera importante a la fuerte inhibición de la síntesis de colesterol que presentan estos pacientes^{4,33}. Finalmente, el compuesto 5,22-colestadien-3β-ol, que es un extraordinario inhibidor de la esteroil Δ²⁴ reductasa, podría comportarse *in vivo* como un potente agente hipocolesterolemiante. No obstante, antes de proponer su utilización con este fin, habría que comprobar la inocuidad de la acumulación de desmosterol en las células.

Bibliografía

- Weihrauch JL, Gardner JM. Sterol contents of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc* 1978;73:39-47.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo JA-ML. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000;80:939-66.
- Heineman T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993;23:827-31.
- Salen G, Shore V, Tint GS, Forte T, Shefer S, Horak I, et al. Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res* 1989;30:1319-30.
- Lee M-H, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genet* 2001;27:79-83.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-5.
- Bhattacharyya AK, Connor WE. β-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 1974;53:1033-43.
- Awad AB, Fink CS. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr* 2000;130:2127-30.
- Moghadasian MH, Frohlich JJ. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med* 1999;107:588-94.
- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J Lipid Res* 1988;29:1573-82.
- Normén L, Dutta P, Lia A, Andersson H. Soy sterol esters and beta-sitosterol ester as inhibitors of cholesterol absorption in the human small bowel. *Am J Clin Nutr* 2000;74:908-13.
- Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, et al. Mutations in the β₅-hydroxysterol Delta 24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet* 2001;69: 685-94.
- Bae SH, Paik YK. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem J* 1997;326: 609-16.
- Koroly MJ, Dempsey ME. Synthesis of delta 5,22-cholestadien-3 β-ol from delta 5,7,22-cholestatrien-3 β-ol by a liver enzyme. *Lipids* 1981;16:755-8.
- Chen H. Role of cholesterol metabolism in cell growth. *Federation Proc* 1984;43:126-30.
- Brown MS, Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* 1974;249: 7306-14.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol starvation decreases p34cdc2 kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *FASEB J* 1999;13:1359-70.
- Suárez Y, Fernández C, Ledo B, Ferruelo AJ, Martín M, Vega MA, et al. Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription: Sterol specificity for cell cycle progression in human cells. *Eur J Biochem* 2002;269: 1761-71.
- Fernández C, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Inhibition of cholesterol biosynthesis by delta 22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol delta 24-reductase in mammalian cells. *Biochem J* 2002;366:109-19.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
- Carrero P, Ortega H, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Flavonoid-induced ability of minimally modified low-density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1125-9.
- Peterson DW. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Biol Med* 1951;78:143-7.
- Miettinen TA, Gylling H. Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:9-14.
- Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant sterol consumption. *FASEB J* 2002;16:1248-53.
- Gylling H, Puska P, Vartiainen E, Miettinen TA. Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population. *J Lipid Res* 1999;40:593-600.
- Hallikainen MA, Uusitupa MI. Effects of low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 1999;69:403-10.
- Law M. Plant sterol and stanol margarines in health. *British J Med* 2000;320:861-4.
- Field FJ, Born E, Mathur SN. Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1997;38:348-60.
- Shefer S, Salen G, Honda A, Batta AK, Nguyen LB, Tint GS, et al. Regulation of rat hepatic 3β-hydroxysteroid Δ⁷-reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation. *J Lipid Res* 1998;39:2471-6.
- Honda A, Salen G, Honda M, Batta AK, Tint GS, Xu G, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity is inhibited by cholesterol and up-regulated by sitosterol in sitosterolemic fibroblasts. *J Lab Clin Med* 2000;135:174-9.
- Bhattacharyya AK. Uptake and esterification of plant sterols by rat small intestine. *Am J Physiol* 1981;240:G50-5.
- Vahouny GV, Connor WE, Subramaniam S, Lin DS, Gallo LL. Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, and fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 1983;37:805-9.
- Miettinen TA. Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 1980;10:27-35.