



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel de la cascada del ácido araquidónico en el control de la proliferación de las células epiteliales intestinales humanas

Marisol Cabral Salvadores

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Papel de la cascada del ácido araquidónico en el
control de la proliferación de las células
epiteliales intestinales humanas**

Marisol Cabral Salvadores
2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO: NUTRICIÓN Y METABOLISMO
Bienio 2006-2008

**Papel de la cascada del ácido araquidónico en el
control de la proliferación de las células
epiteliales intestinales humanas**

Memoria presentada por Marisol Cabral Salvadores para optar al Título de Doctor por
la Universidad de Barcelona

Directores

Juan José Moreno Aznárez

Raquel Martín Venegas

Doctoranda

Marisol Cabral Salvadores
2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Juan José Moreno Aznárez y **Raquel Martín Venegas**, profesores del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

INFORMAN:

Que la memoria titulada “Papel de la cascada del ácido araquidónico en el control de la proliferación de las células epiteliales intestinales humanas” presentada por **MARISOL CABRAL SALVADORES** para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología, y considerándola finalizada, autorizamos su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente, en Barcelona a 20 de julio de 2015.

Juan José Moreno Aznárez

Raquel Martín Venegas

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2007-61727/BFI) y de la Generalitat de Catalunya (2005SGR0269 y 2009SGR0438).

Esta tesis doctoral la he realizado a destiempo, a una edad que no se corresponde, con hijas adolescentes, trabajando y viviendo lejos de Barcelona. Pero este destiempo, en contra de lo que pudiera parecer, ha dejado de ser un problema gracias a la ayuda, el apoyo, la generosidad de muchas personas a las que estoy inmensamente agradecida.

Gracias a mis directores el Dr. Juan José Moreno y la Dra. Raquel Martín Venegas, por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis, por su valentía al aceptar dirigirla, una doctoranda atípica representa una dirección fuera de lo corriente, una dirección nada cómoda. Me han dedicado tiempo, esfuerzo, paciencia y muy buenos momentos. Con ellos he aprendido, técnicas, metodologías pero sobre todo que el trabajo científico necesita mucha humildad, constancia y saber esperar los destellos del gozo intelectual.

Gracias a Carolina Storniolo, mi compañera. Horas de sala de cultivo, discusiones sobre que puede haber fallado, alegrías delante del experimento que funciona. Una tesis no es el trabajo de una única persona, y en este caso sin Carolina esta tesis no hubiera sido posible, y no solo por su inestimable ayuda con las Caco-2, sino por compartir estos años de laboratorio, siempre evitando el desánimo, siempre generosa con su tiempo.

Gracias a la Dra. Ruth Ferrer por su visión práctica y eficiente del trabajo científico, gracias a Teresa Brufau y M^a Jose Rodríguez-Lagunas por su apoyo y ayuda.

Gracias a todos los compañeros y compañeras del departamento de Fisiología de Farmacia, porque todos en algún momento me han animado y ayudado. Gracias a Teresa Pérez y Sara Ramos, porque fueron ellas las que me insistieron y me pusieron en contacto con el departamento de Fisiología para realizar esta tesis

Gracias a el Dr. Jaume Comas y la Dra. Olga Jáuregui del Centro Científico y Tecnológico de la Universidad de Barcelona por su ayuda y consejos con el espectrómetro de masas y las técnicas utilizadas en citometría y apoptosis. Gracias a la Dra. M^o Antonia Busquets por su ayuda en las determinaciones de fluorescencia polarizada.

Gracias a la Dra. Montserrat Esteve porque desde la comisión evaluadora del doctorado cada año me ha animado.

Gracias a todos mis compañeros del Instituto Jaume Callís de Vic, entre ellos Inma Riera que ha impedido que me ahogue en instrucciones y fechas burocráticas, Cesca, Montse y Anna que me han solucionado dudas y dificultades.

Gracias a mis amigos y amigas de Gran Canaria, de Barcelona y de l'Esquirol, con los que he compartido muchos años y también esta tesis.

Gracias a mis amigas de la facultad de Biología.

Gracias a Alicia, Mabel y Saro con ellas he vivido la vida.

Gracias a mi familia, catalana y canaria, sin ella hubiera sido incapaz de iniciar y acabar esta aventura: mi pareja, Josep, mis hijas Duna y Violeta, mi madre Aida, mi hermana Mireya, tíos, sobrinos, primos y a los que ya no están, especialmente a mi padre, Antonio, un hombre inquieto, lleno de curiosidad, al que le hubiera encantado leer esta tesis y preguntarme el significado de cada página.

Fuera de las paredes del laboratorio el tiempo pasa, se han logrado importantes avances en la detección y tratamiento del cáncer colorrectal, mis hijas ya son jóvenes, Carolina está a punto de ser madre y por azar acabo esta tesis en un momento políticamente convulso. Esperemos que el futuro incierto que tenemos delante nos reporte mejoras en todos los ámbitos.

Gracias a todos.

*Sólo somos la arena que forma esta isla seca,
sólo la espuma de este mar que escuece.*

Una ola quieta espera a la siguiente, ¿que pude hacer sola?

Anónimos de Gran Canaria

A Pepita Roure, maestra republicana.

A mis hijas Duna y Violeta

Índice de Figuras y Tablas	III
Abreviaturas	V
Resumen.....	VII
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Ácidos grasos	3
1.2 Enzimas de la cascada del ácido araquidónico.....	6
1.2.1 Las fosfolipasas	7
1.2.2 La vía de las ciclooxigenasas	9
1.2.3 La vía de las lipoxigenasas	11
1.2.4 La vía del citocromo P450	15
1.3 Receptores y señalización celular de los eicosanoides	17
1.3.1 Receptores y señalización celular de los prostanoides.....	17
1.3.2 Receptores y señalización celular de los leucotrienos, ácidos hidroxieicosatetraenoicos e hidroxiocadecadienoicos.....	18
1.4 Efecto de los eicosanoides sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en el cáncer colorrectal	20
1.4.1 Papel de la vía de las ciclooxigenasas en el cáncer colorrectal.....	23
1.4.2 Papel de la vía de la vía de las lipoxigenasas en el cáncer colorrectal	24
2. OBJETIVOS	27

3. RESULTADOS	31
3.1 Artículo 1.	
Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell.	33
3.2 Artículo 2.	
Differential cell growth/apoptosis behavior of hydroxyoctadecadienoic acid enantiomers in a colorectal cell line.	47
3.3 Artículo 3.	
Leukotriene D4-induced Caco-2 cell proliferation is mediated by prostaglandin E2 synthesis ...	57
3.4 Artículo 4.	
Eicosapentaenoic acid and eicosapentaenoic acid-derived eicosanoids are involved in human colorectal carcinoma cell line proliferation	67
4. DISCUSIÓN	99
5. CONCLUSIONES	115
6. BIBLIOGRAFÍA	119

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructura de los ácidos grasos	3
Figura 1.2. Proceso de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados	4
Figura 1.3. Concentración de ácidos grasos poliinsaturados en diferentes tejidos y órganos	6
Figura 1.4. Esquema de la cascada del ácido araquidónico	7
Figura 1.5. Principales vías de liberación del ácido araquidónico	8
Figura 1.6. Metabolización de los ácidos araquidónico y eicosapentaenoico por la vía de las ciclooxigenasas	11
Figura 1.7. Metabolización de los ácidos araquidónico y eicosapentaenoico por la vía de la 5- lipooxigenasa	13
Figura 1.8. Metabolización de los ácidos araquidónico, eicosapentaenoico y linoleico por la vía de la 12/15 lipooxigenasa	15
Figura 1.9. Principales eicosanoides producidos a partir de los ácidos araquidónico y eicosapentaenoico por la vía del citocromo P450	17
Figura 1.10. Efectos biológicos más relevantes de los eicosanoides	20
Figura 1.11. Etapas del desarrollo del cáncer colorrectal	22
Figura 1.12. Expresión de la ciclooxigenasa-2 en la mucosa de colon	24
Figura 4.1. Efecto de la PGE ₂ sobre las vías de señalización implicadas en el control del crecimiento celular	109
Figura 4.2. El efecto proliferativo de los leucotrienos y los ácidos 12-hidroxieicosatetraenoico y 13-R- hidroioctadecadienoico depende de la síntesis de prostaglandina E2	110

Figura 5.1. Metabolitos de la cascada del ácido araquidónico que tienen efecto proliferativo y no proliferativo en las células epiteliales intestinales no diferenciadas110

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Agonistas y antagonistas de los receptores más representativos de los eicosanoides 19

Tabla 4.1. Vías de señalización activadas por parte de los metabolitos derivados de los ácidos araquidónico, eicosapentaenoico y linoleico107

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ACF	Foco de cripta aberrante
AGs	Ácidos grasos
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALA	Ácido α -linoleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APC	<i>Adenomatous polyposi coli</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
BLT	Receptor de LTB
CaMKs	<i>Calmodulin-dependent protein kinases</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
COX	Ciclooxigenasa
cPLA₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica dependiente de Ca ²⁺
CRC	Cáncer colorrectal
CREB	cAMP response element-binding protein
CRTH₂	Molécula homóloga al receptor quimio-atrayente
CYP450	Citocromo P450
Cis-LT	Cisteinil leucotrieno
Cis-LTR	Receptor de cisteinil leucotrieno
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHETE	Ácido dihidroxieicosatetraenoico
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Receptor de las prostaglandinas D
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EETeTr	Ácido epoxieicosatetraenoico
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	Receptor de las prostaglandinas E

EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK	<i>Extracellular regulated protein kinase</i>
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLAP	<i>5-lipoxygenase-activating protein</i>
GPCR	Receptor acoplado a la proteína G
GSK	<i>Glycogen synthase protein kinase</i>
HEPE	Ácido hidroxieicosapentaenoico
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HODE	Ácido hidroxiocadecadienoico
HPEPE	Ácido hidroperoxieicosapentaenoico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
IBD	Enfermedad intestinal inflamatoria
LA	Ácido linoleico
LOX	Lipoxigenasa
LT	Leucotrieno
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinasa</i>
MUFAs	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
NDGA	Ácido nordihidroguaiaretico
PAF-AH	Acetilhidrolasas del factor activador de plaqueta:
PBS	Solución tamponada de fosfatos
PG	Prostaglandina
PGDH	Hidroxi prostaglandina deshidrogenasa
PGES	Prostaglandina E sintasa
PK	Protein kinasa
PL	Fosfolipasa
PPAR	<i>Peroxisoma Proliferator-Activated Receptor</i>
PUFAs	<i>Poliunsaturated fatty acids</i>
SRC-1	Receptor nuclear esteroide coactivador-1
SFAs	<i>Saturated fatty acids</i>
Tx	Tromboxano
Wnt	<i>Wingless-type MMTV Integration Site Family</i>

El ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido linoleico (LA) son tres ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que se encuentran formando parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. El AA, el EPA y el LA, después de ser liberados, pueden ser metabolizados por la vía de las ciclooxigenas (COXs), la vía de las lipoxigenasas (LOXs) y la vía del citocromo P450 (CYP450), que constituyen la cascada del AA. Los metabolitos que se generan son los eicosanoides y los ácidos hidroxióctadecanoicos (HODEs), todos ellos con efectos pleiotrópicos. Una de las funciones que regulan los eicosanoides es el crecimiento celular y como consecuencia pueden estar involucrados en el cáncer y concretamente en el cáncer colorrectal (CRC). Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el papel de la cascada del AA en el control de la proliferación de células epiteliales intestinales humanas. Como modelo experimental se han utilizado células epiteliales intestinales no diferenciadas Caco-2 procedentes de un adenocarcinoma. Los resultados indican que las células Caco-2 sintetizan prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno B₄ (LTB₄) y los ácidos hidroxiéicosatetraenoicos 5-HETE, 12-HETE y 15-HETE. Estos eicosanoides, junto con LTD₄ y 13-R-HODE, inducen el crecimiento celular y la síntesis de ADN. Estos efectos son consecuencia de la interacción de la PGE₂ con los receptores EP₁ y EP₄, el LTB₄ y el 13-R-HODE con los receptores BLT₁ y BLT₂, el 12-HETE con BLT₂ y el LTD₄ con el receptor Cis-LT₁R. Además, cuando se unen a sus receptores activan diferentes vías de señalización implicadas en la regulación de la proliferación celular. Cabe destacar que los dos enantiómeros del 13-HODE presentan efectos contrarios. Así, mientras que el 13-R-HODE presenta un efecto proliferativo, el 13-S-HODE inhibe el crecimiento e induce apoptosis al unirse a PPAR γ . En relación a los derivados del EPA, tanto la PGE₃ como el 12-HEPE inducen la proliferación de las células Caco-2 de forma similar a la PGE₂ y al 12-HETE, mientras que el LTB₅ no es mitogénico. Finalmente, en este trabajo se propone que el efecto proliferativo de LTB₄, 12-HETE, LTD₄ y 13-R-HODE podría deberse principalmente a la activación de la vía COXs y la subsecuente síntesis de PGE₂, que a su vez activaría múltiples vías de señalización implicadas en la proliferación celular. En conjunto, estos estudios proporcionan nuevas evidencias que puedan ser consideradas en futuras investigaciones sobre el CRC.

1 INTRODUCCIÓN

Después de su ingestión, tanto el LA como el ALA son metabolizados principalmente en el hígado por una serie de desaturasas y elongasas, que alternan la desaturación oxidativa y la elongación de la cadena carbonada en unidades de dos carbonos (Figura 1.2). Una vez introducida la primera insaturación, las siguientes se agregan hacia el extremo carboxilo. La conversión de LA y ALA a otros PUFAs es un proceso poco eficiente, sobretudo en personas adultas, de manera que lo más habitual es incorporar estos AGs también a través de la dieta (Swanson *et al.*, 2012). Así, los alimentos que contienen grasas de origen animal proporcionan cantidades apreciables de AA preformado (Coronado *et al.*, 2006), mientras que el aceite de pescado es un buen aporte de EPA y DHA ya que el plancton y las algas, ricos en ALA, son la base de la cadena alimentaria del atún, del salmón, del arenque y de otros peces de agua fría (Roynette *et al.*, 2004).

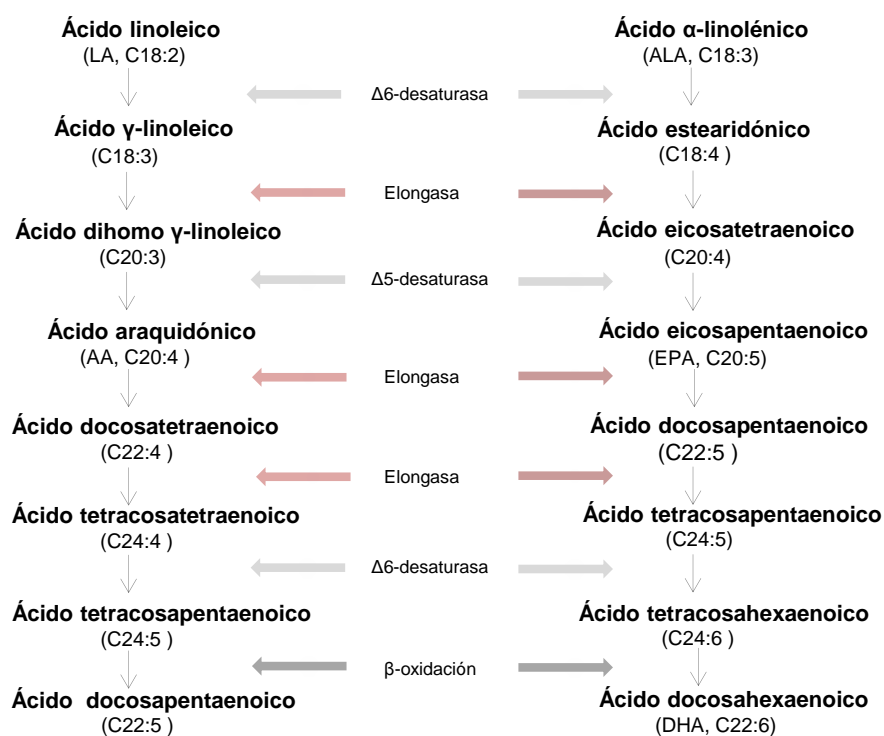


Figura 1.2. Proceso de biosíntesis de PUFAs derivados del LA (ω -6) y ALA (ω -3) a través de procesos de desaturación y elongación (adaptado a partir de Beaudoin *et al.*, 2000).

Los PUFAs se incorporan a las membranas celulares, especialmente a la bicapa lipídica de la membrana plasmática, condicionando la estructura de ésta, modificando su fluidez y, por tanto, regulando su permeabilidad. En este sentido, se ha descrito que el perfil de los AGs de la dieta influye en la configuración y función de la membrana celular (Baylin y Campos, 2006). Así, una mayor proporción de PUFAs ω -3 da lugar a un incremento de su fluidez debido a un mayor número de dobles

enlaces (Connor, 2000). Además, los PUFAs modulan la actividad de enzimas, de receptores celulares y de canales iónicos que forman parte de la membrana, a la vez que permiten los procesos de endocitosis y exocitosis (Salem *et al.*, 1988).

El AA y el EPA se encuentran formando parte de los fosfolípidos, principalmente de los glicerofosfolípidos de las membranas celulares. Estos AGs se encuentran unidos mediante enlace éster preferentemente en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol. El EPA también forma parte de la esfingomielina, un tipo de fosfolípido que en vez de glicerol está formado por otro alcohol, la esfingosina.

El perfil de PUFAs que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares varía según el tejido (Leidl *et al.*, 2008) (Figura 1.3). Así los PUFAs ω -6 se encuentran en las membranas de la mayoría de los tejidos, siendo el principal el AA que representa un 13% en el hígado y un 17-18% en el bazo y en los eritrocitos. En cambio la proporción de PUFAs ω -3 es baja en la mayoría de tejidos, aunque el DHA se encuentra en gran cantidad en el tejido nervioso de la corteza cerebral y la retina (Arterburn *et al.*, 2006). Las cantidades de EPA que están presentes en los diferentes tejidos son muy pequeñas, lo que sugiere una capacidad de almacenamiento limitada de este AG e implica la necesidad de un continuo suministro a través de la dieta (Geerling *et al.*, 1999). Los estudios con suplementación de EPA en la dieta realizados en individuos adultos muestran un incremento del EPA en los fosfolípidos plasmáticos mientras que las concentraciones del AA disminuyen (Blonk *et al.*, 1990). En estudios con animales se han observado los mismos resultados en corazón, músculo esquelético, hígado, cerebro y eritrocitos (Moriguchi *et al.*, 2004). Por tanto, dependiendo de la dieta, el EPA puede substituir a los PUFAs de la serie ω -6, principalmente el AA (Arterburn *et al.*, 2006).

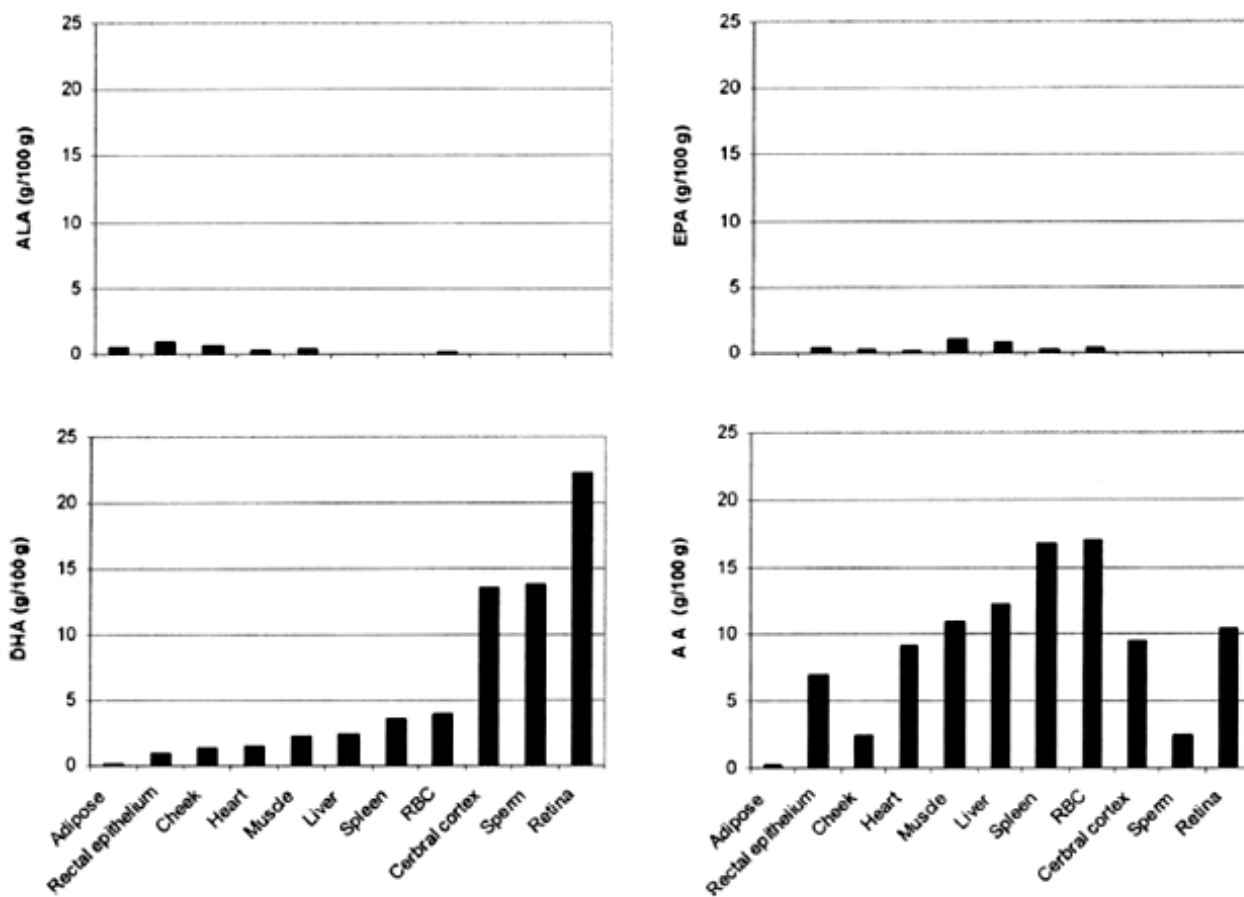


Figura 1.3. Concentraciones (g/100g de AGs totales) de PUFAs (ALA, EPA, DHA y AA) en diferentes tejidos y órganos de personas adultas (Arterburn *et al.*, 2006).

1.2. Enzimas de la cascada del ácido araquidónico

La cascada del AA incluye una serie de reacciones, donde participan numerosos enzimas, que generan un amplio grupo de metabolitos como resultado de la oxidación de diferentes PUFAs (AA, LA, di-homo- γ -linolenico, EPA y DHA).

La primera etapa de la cascada es la liberación de los AGs de los fosfolípidos de membrana como consecuencia de la activación de las fosfolipasas. La segunda etapa es su posterior metabolización por una de las siguientes vías: la vía de las ciclooxygenas (COXs), la vía de las lipoxigenasas (LOXs) y la vía del citocromo P450 (CYP450). Estas vías dan lugar a metabolitos biológicamente activos, llamados colectivamente eicosanoides (Figura 1.4), palabra que deriva del griego *eikosi* que significa 20 ya que todos ellos son moléculas de 20 carbonos. Una excepción son los ácidos hidroxióctadecadienoicos (HODEs), metabolitos de 18 carbonos que se pueden formar a partir del LA.

Cada eicosanoide se denomina con un número que indica los dobles enlaces que contiene. La serie 1 incluye eicosanoides que presentan un único doble enlace y provienen del ácido di-homo- γ -linolenico; las series 2 y 4 incluyen eicosanoides que presentan 2 y 4 dobles enlaces respectivamente y proceden del AA; y por último, las series 3 y 5 incluye eicosanoides que presentan 3 y 5 dobles enlaces respectivamente y proceden del EPA.

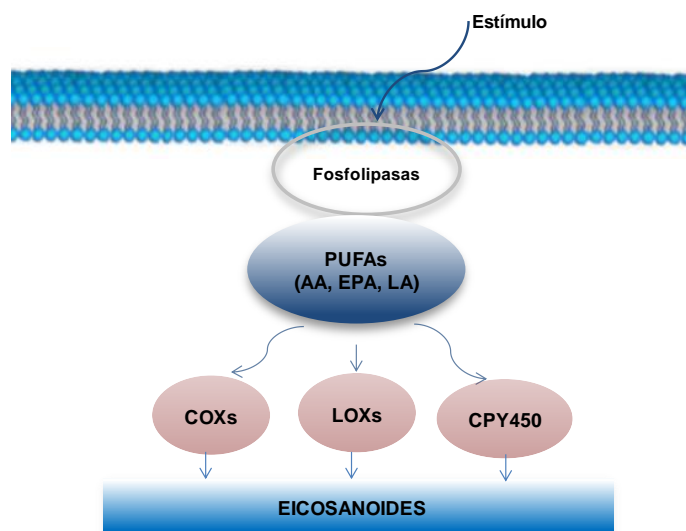


Figura 1.4. Esquema de la cascada del AA. Las fosfolipasas, en respuesta a estímulos fisiológicos, liberan AGs como el AA, EPA y LA, que serán metabolizados por la vía de las COXs, las LOXs o del CYP450 para dar lugar a una amplia variedad de eicosanoides.

1.2.1. Las fosfolipasas

La concentración de AGs libres en la célula en estado basal es muy baja gracias al equilibrio entre las actividades fosfolipasa y aciltransferasa que hidrolizan y reesterifican los AGs. Ambas actividades son fundamentales para la célula ya que permiten el recambio de los AGs oxidados, proceso indispensable para mantener la integridad de las membranas celulares (Irvine, 1982; Leslie, 1997). Las fosfolipasas (PLs) son enzimas que rompen los enlaces éster presentes en los fosfolípidos. Dependiendo del enlace éster que hidrolizan, se clasifican como PLA₁, PLA₂, PLB, PLC y PLD.

Las PLA₁ hidrolizan el enlace éster entre el primer AG y el glicerol. Las PLA₂ entre el segundo AG y el glicerol. Las PLB hidrolizan el enlace éster del primer y del segundo AG con el glicerol. Las PLC entre el glicerol y el grupo fosfato y las PLD entre el fosfato y un grupo variable que comúnmente es un aminoalcohol. A su vez las PLA₂ se clasifican según su secuencia de nucleótidos (Balsinde *et al.*, 1999). A medida que se han ido descubriendo nuevas PLA₂ se han realizado nuevas

clasificaciones (Dennis, 1994 y 1997; Six y Dennis, 2000; Schaloske *et al.*, 2005). Actualmente se han descrito 16 grupos que, atendiendo a sus propiedades bioquímicas, se clasifican en cinco familias:

- fosfolipasas secretadas dependientes de Ca^{2+} (sPLA₂)
- fosfolipasas citosólicas dependientes de Ca^{2+} (cPLA₂)
- fosfolipasas citosólicas independientes de Ca^{2+} (iPLA₂)
- acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH)
- fosfolipasas A₂ lisosomales (IPLA₂)

El AA se puede liberar de la membrana por tres procesos mediante la acción de diferentes PLA₂ (Figura 1.5):

- las sPLA₂, las cPLA₂ y las iPLA₂ liberan AA y un lisofosfolípido (Fonteh *et al.*, 1994)
- las PLC y una digliceridolipasa generan AA y un monoacilglicérido (Bell *et al.*, 1979)
- y las PLC y una diacilglicerolquinasa producen ácido fosfátidico sobre el que actúa una sPLA₂ y que finalmente liberan el AA y el ácido lisofosfátidico (Irvine, 1982).

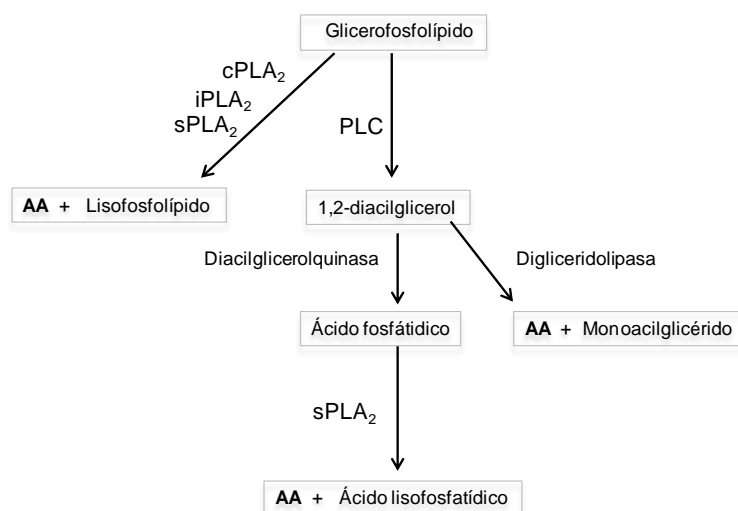


Figura 1.5. Principales vías de liberación del AA a partir de glicerofosfolípidos presentes en la bicapa fosfolipídica.

Las cPLA₂ están consideradas como las principales enzimas implicadas en la liberación del AA (Fujishima *et al.*, 1999) ya que son las únicas enzimas de esta familia que presentan especificidad por los fosfolípidos que contienen PUFAs en la posición sn-2, siendo el AA el mayoritario. Actúan en respuesta a incrementos de la concentración de Ca^{2+} intracelular que produce su translocación del citosol a la región perinuclear (aparato de Golgi, retículo endoplasmático y membrana nuclear), donde

facilita la liberación del AA (Hirabayashi *et al.*, 2004). Las iPLA₂, aunque actúan en condiciones de reposo celular manteniendo la homeostasis de la membrana, pueden liberar AA al incrementar su actividad en respuesta a ciertos estímulos, como el estrés oxidativo (Martínez y Moreno, 2001; Balboa y Balsinde, 2002; Akiba y Sato, 2004). Por otra parte se ha observado que las cPLA₂, las sPLA₂ y las iPLA₂ no discriminan entre EPA y AA ni *in vitro* (Hanel *et al.*, 1993; Sanchez y Moreno, 2001; Wada *et al.*, 2007) ni *in vivo* (Mahadevappa y Holub, 1987).

1.2.2. La vía de las ciclooxigenasas

Se han identificado y caracterizado dos isoformas de COXs, la COX-1 (Hla *et al.*, 1986; Yokoyama y Tanabe, 1989) y la COX-2 (Kujubu *et al.*, 1991; Hla y Neilson, 1992). El gen que codifica COX-1 está localizado en el cromosoma 9q32-q33.3 mientras que el que codifica COX-2 se encuentra en el 1q25.2-q25.3. Ambas son hemoproteínas homodiméricas glicosiladas, localizadas en el lumen del retículo endoplasmático y en la membrana nuclear y con un peso molecular bastante similar, 70 kDa la COX-1 (Smith *et al.*, 1996) y 72 kDa la COX-2 (Hla y Neilson, 1992). Presentan una actividad enzimática similar y están formadas aproximadamente por 600 aminoácidos, de los cuales el 60% son idénticos en ambas isoformas y estructurados en cuatro dominios: un dominio amino terminal, un dominio de dimerización, un dominio de unión con la membrana y un dominio catalítico donde se encuentra el centro activo. En la COX-2 éste es de mayor tamaño ya que la sustitución de una isoleucina por una valina en el sitio de unión permite el acceso a moléculas de mayor volumen lo que facilita, respecto a la COX-1, la oxidación de AGs como el EPA y el DHA (Simmons *et al.*, 2004). Por otra parte la expresión de cada isomorfa se regula de forma diferente:

- COX-1 se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos y genera eicosanoides que participan en funciones fisiológicas tales como la agregación plaquetaria, la regulación del flujo sanguíneo renal y la citoprotección de la mucosa gástrica (Kraemer *et al.*, 1992).
- COX-2 es inducida por estímulos proinflamatorios como citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales. La desregulación de la expresión de COX-2 está implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y en el desarrollo del cáncer (Herschman, 1994).

Esta diferencia de expresión no se cumple siempre ya que COX-1 puede ser inducida en ciertas condiciones y COX-2 se expresa de forma constitutiva por lo menos en el cerebro, riñón y megacariocitos (Morita *et al.*, 2002). Además en el año 2002 se caracterizó, en la corteza cerebral

canina, una nueva isoforma de la COX, la COX-3. Esta enzima ha sido identificada como una variante de la COX-1 y, aunque aún no se conoce su función, está presente principalmente en el tejido nervioso humano de la corteza cerebral y la médula espinal (Kis *et al.*, 2003; Sobolewski *et al.*, 2010).

COX-1 y COX-2 metabolizan los AGs dando lugar a la síntesis de una serie de eicosanoides llamados prostanoides que incluyen las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (Tx). Las PGs tiene un esqueleto básico de ácido prostanoico, una molécula de 20 átomos de carbono formando un anillo ciclopentano con un carboxilo y una cadena lateral alifática. Las distintas sustituciones del ciclopentano hacen que las PGs se identifiquen con letras del alfabeto: A, B, C, D, E, F, G y H. Los Tx derivan también del ácido prostanoico pero a diferencia de las PGs, contienen un anillo ciclohexano con un grupo éter y son producidos principalmente en las membranas de las plaquetas (Needleman *et al.*, 1976). Los Tx más comunes son el TxA₂ y su derivado, el TxB₂.

Las COXs poseen dos actividades enzimáticas, la actividad ciclooxygena que convierte el AA y el EPA en PGG₂ y PGG₃ respectivamente, y la actividad peroxidasa que convierte estas últimas en endoperóxidos cíclicos inestables, las PGH₂ y PGH₃, respectivamente (Figura 1.6). La PGH₂, al ser metabolizada por la PG sintasa correspondiente, origina las PGs de la serie 2 como la PGD₂, PGE₂, PGF₂ y PGI₂, mientras que al ser metabolizada por la Tx sintetasa forma el TxA₂. A su vez, a partir de la PGH₃ se forman PGs de la serie 3 como la PGD₃, PGE₃, PGF₃α, PGI₃ y el TxA₃. COX-1 metaboliza principalmente el AA y solo en un 5-10% el EPA (Needleman *et al.*, 1980; Morita *et al.*, 1983). Más recientemente, se ha reportado que la COX-2 presenta una actividad enzimática un 35 % inferior para el EPA con respecto al AA (Wada *et al.*, 2007). Así, la concentración celular de PGE₃ es significativamente inferior que la de PGE₂ (Hawcroft *et al.*, 2010).

Las PGs formadas son metabolizadas en pocos minutos por la 15-hidroxi prostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH) que cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las PGs y las convierte en metabolitos inactivos (Hansen, 1976).

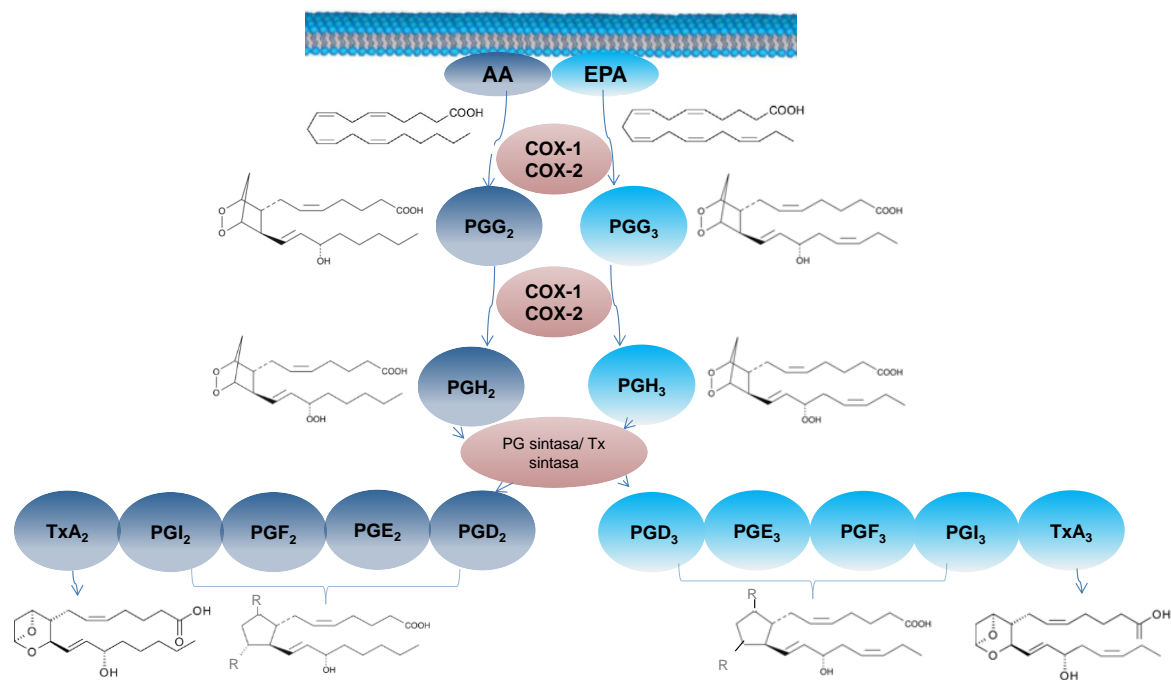


Figura 1.6. Metabolización del AA y el EPA por la vía de las COXs para formar PGs y Txs de la serie 2 y de la serie 3, respectivamente.

1.2.3. La vía de las lipoxigenasas

Las LOXs están formadas por una cadena polipeptídica con un peso molecular de 75 a 80 kDa en los animales. Presenta un dominio pequeño N-terminal y un dominio catalítico mayor que contiene un átomo de hierro no hemo. Las LOXs constituyen una familia de dioxigenasas que, de forma estereoespecífica, insertan una molécula de oxígeno en el AA libre para sintetizar ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs). A su vez, estos son metabolizados a leucotrienos (LTs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), hepoxilinas y lipoxinas. Cuando oxidan el EPA se forman los ácidos hidroperoxieicosapentaenoicos (HPEPEs) que darán lugar a LTs, ácidos hidroxieicosapentaenoicos (HEPEs) y resolvinas. También oxidan el LA a HODEs. Las LOXs se clasifican según la posición de oxidación del AG en 5-, 8-, 9-, 11-, 12- y 15-LOX, aunque sólo se han identificado en humanos la 5-LOX, la 12-LOX y la 15-LOX.

El gen de la 5-LOX se ha localizado en el cromosoma 10q11.2. La metabolización del AA y del EPA por esta enzima produce 5-HPETE y 5-HPEPE respectivamente, seguido de una deshidratación que da lugar al LTA (Figura 1.7). El 5-HPETE y el 5-HPEPE pueden ser también sustrato de la glutatión peroxidasa originando el 5-HETE y el 5-HEPE en neutrófilos, basófilos y

eosinófilos (Dodge y Thomas, 1985). Estímulos diversos que provocan un aumento del Ca^{2+} intracelular originan la translocación de la 5-LOX desde el citosol o el núcleo a la membrana nuclear, donde interacciona con la cPLA₂ y la FLAP (*Five Lipoxygenase Activating Protein*). La FLAP es una proteína de membrana nuclear integral de 18 kDa, capaz de transferir el AA o el EPA a la membrana nuclear y permitir la unión de estos dos PUFAs con el centro activo de la 5-LOX (Jiang *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 1990). La FLAP potencia la formación relativa de LTA₄ y LTA₅ frente 5-HETE o 5-HEPE respectivamente y por tanto es esencial para la biosíntesis de LTs en las células de numerosos tejidos (Plante *et al.*, 2006). Ambos LTs son epóxidos alílicos inestables, que pueden seguir diferentes rutas metabólicas para originar nuevos eicosanoides (Gronert, 1999). Así, el LTA₄ es metabolizado a LTB₄ por la LTA₄ hidrolasa en neutrófilos, monocitos y macrófagos (Funk, 2001). El LTA₄ también es metabolizado a LTC₄ por la LTC₄ sintasa (Aparoy *et al.*, 2012). Éste, a su vez, es convertido a LTD₄ y LTE₄ por reacciones secuenciales catalizadas por una γ -glutamil transferasa y una dipeptidasa. Tanto LTD₄ como LTE₄ son también denominados peptidoleucotrienos o cisteinileucotrienos (Cis-LTs) (Bishayee y Khuda-Bukhsh, 2013) debido a su composición y son principalmente producidos en mastocitos, basófilos y eosinófilos. La formación de LTB₅, metabolito mayoritariamente producido en neutrófilos, comparte la mayoría de enzimas que actúan en la síntesis del LTB₄. A partir del EPA también se forman la resolvina E₁ con la participación previa de la COX-2 o del CYP450 (Serhan *et al.*, 2008).

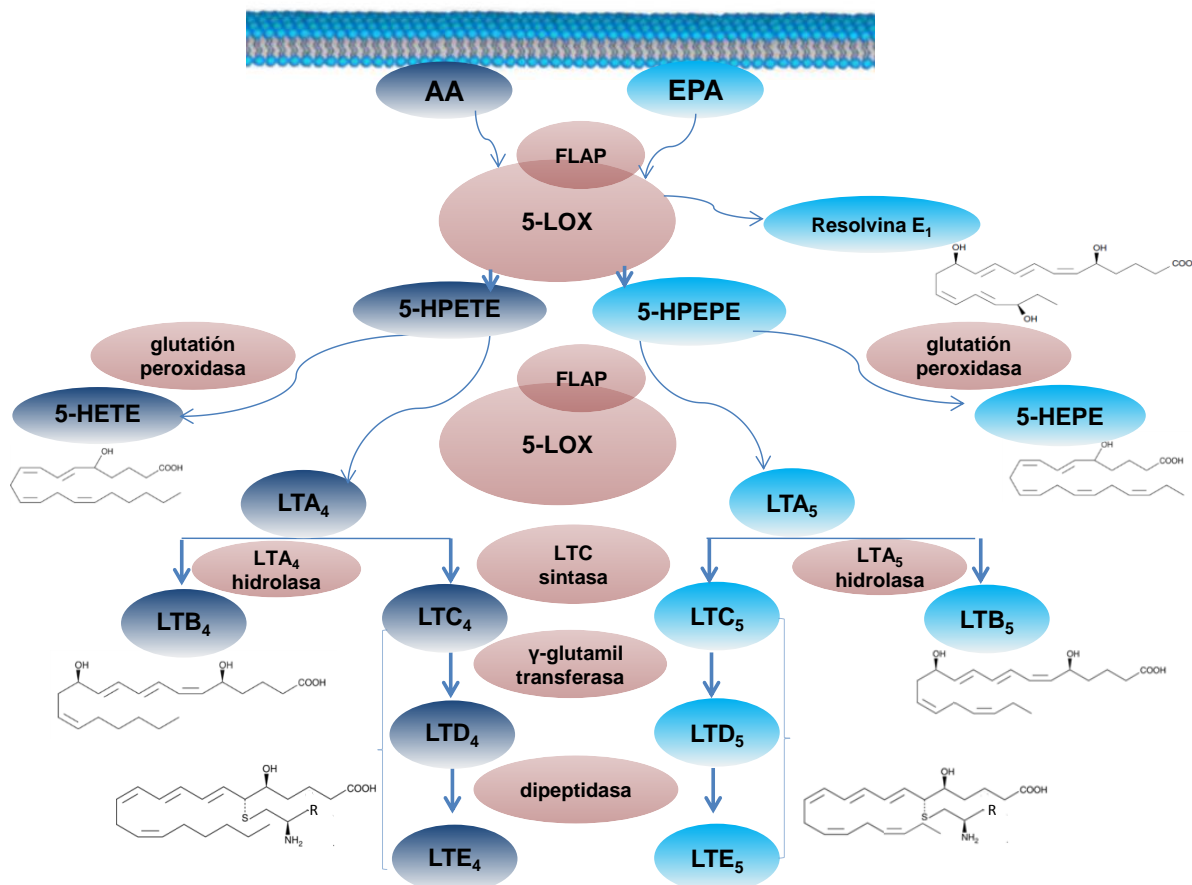


Figura 1.7. Metabolización del AA y el EPA por la vía de la 5-LOX para formar LTs de la serie 4 y de la serie 5, así como HETEs y HEPES.

El gen de la 12-LOX y el gen de la 15-LOX-1 (una de las dos isoformas de la 15-LOX) se localizan en el cromosoma 17p13.3 (Chen *et al.*, 1994). Las dos enzimas presentan una homología de identidad de un 94 a un 98% y forman productos similares a partir de los mismos sustratos, de manera que para diversos autores constituyen ambas una única enzima, la 12/15 LOX (Kuhn y Thiele, 1999; Kuhn *et al.*, 2002; Natarajan y Nadler, 2004). Estas enzimas metabolizan el AA a 12-HPETE y a 15-HPETE y el EPA a 12-HPEPE y a 15-HPEPE, con la característica que la 12-LOX producirá en mayor cantidad 12-HPETE y 12-HPEPE que 15-HPETE y 15-HPEPE, mientras que si actúa la 15-LOX-1 la formación relativa de estos eicosanoides será a la inversa. Sobre estos metabolitos actúa la glutatión peroxidasa produciendo 12/15-HETE y 12/15-HEPE respectivamente. Estas enzimas también metabolizan el LA a 9-S-HODE y a 13-S-HODE (Figura 1.8). El 12-HPETE en neutrófilos y en neuronas de la corteza cerebral, también puede actuar de sustrato de la enzima hepoxilin sintetasa formando las hepoxilinas, metabolitos relacionados con la inflamación y la secreción de insulina (Pace-Asciak, 2009). Así mismo, las lipoxinas, como la lipoxina A₄, se originan como resultado del

metabolismo transcelular que actúa sobre el AA, en el que interviene diferentes tipos celulares y diferentes LOXs, como la 5-LOX y la 12-LOX (Serhan *et al.*, 2008).

La 12-LOX presenta varias isoformas con diferente localización y especificidad por el sustrato (Walstra *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1988; Yamamoto, 1992). Así, la 12-LOX presente en plaquetas humanas metaboliza el AA a 12-S-HETE (Funk *et al.*, 1990), en leucocitos puede metabolizar el AA a 12-S-HETE y 15-S-HETE y el LA a 9-S-HODE (Hada *et al.*, 1991) y en células epiteliales existen dos isoformas que metabolizan el AA a 12-R-HETE y 12-S-HETE (Boeglin *et al.*, 1998). El 12-S-HETE también se sintetiza en células musculares y macrófagos (Kurahashi *et al.*, 2000). La 15-LOX-1 se expresa preferentemente en eritrocitos, eosinófilos, macrófagos y células epiteliales de tráquea, bronquios, piel y colon (McDonnell *et al.*, 2001; Hsi *et al.*, 2002) y metaboliza preferentemente el LA dando lugar al 13-S-HODE. El 13-R-HODE, igual que el 9-R-HODE, puede ser sintetizado por las LOXs y las COXs, así como por procesos de autooxidación (Baer *et al.*, 1991a y 1991b; Oliw *et al.*, 1993; Bayer *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2009).

La 15-LOX-2 se ha localizado en el cromosoma 11 del ratón, pero no ha sido todavía localizada en cromosomas humanos, aunque se expresa en algunos tejidos como en la córnea, próstata, pulmón y piel (Brash *et al.*, 1997). Esta enzima tiene como principal sustrato el AA a partir del cual se sintetiza 15-S-HETE. Su enantiómero, el 15-R-HETE, se forma por procesos no enzimáticos (Lecomte *et al.*, 1994) y su significado clínico está en investigación (Levy *et al.*, 2002).

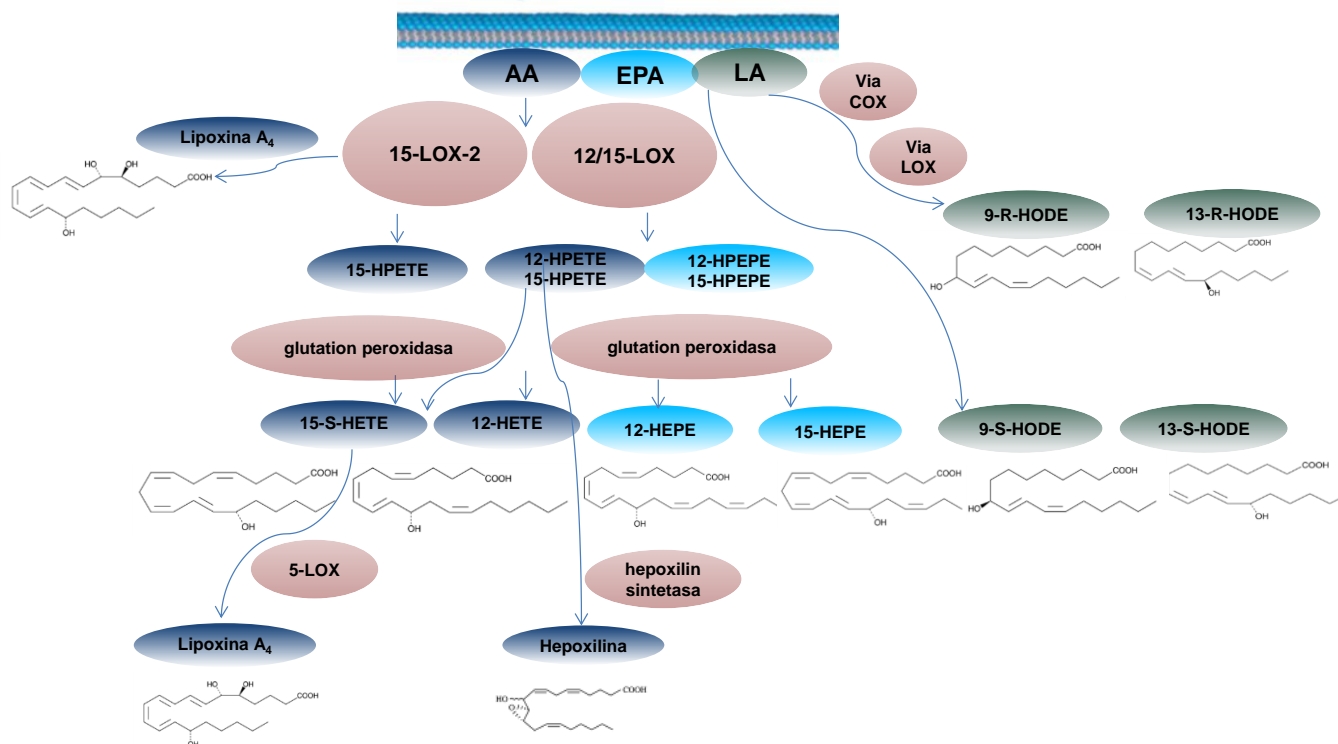


Figura 1.8. Metabolización del AA, el EPA y el LA por la vía de la 12/15-LOX para formar HETEs, HEPES y HODEs.

1.2.4. La vía del citocromo P450

El CYP450 es una amplia familia de enzimas con actividad monooxigenasa que contienen un grupo hemo. En mamíferos se han clonado y secuenciado 17 familias génicas que agrupan un total de 500 isoformas (Nelson *et al.*, 1996). Aunque la mayoría de estos genes se expresan de forma constitutiva, la transcripción de alguno de ellos está regulada por numerosos factores como hormonas, citoquinas, determinados fármacos y compuestos químicos (Waxman, 1999; Capdevila *et al.*, 2000). Las monooxigenasas del CYP450 metabolizan una gran variedad de sustratos como colesterol, AGs incluidos los PUFAs, ácidos biliares, vitaminas, eicosanoides, xenobióticos y fármacos (Williams *et al.*, 1984). Los PUFAs son metabolizados por el CYP450 a través de tres tipos de reacciones: $\omega/\omega-1$ hidroxilación, oxidación bis-aliílica y epoxidación (Figura 1.9):

- La $\omega/\omega-1$ hidroxilación del AA la realizan diferentes isoformas del CYP450 que dan lugar a la formación de 16-, 17-, 18-, 19- y 20-HETE, según incorporen un grupo hidroxilo en ω , $\omega-1$, $\omega-2$, $\omega-3$ y $\omega-4$ respectivamente (Sharma *et al.*, 1989). La ω -hidroxilación del EPA da lugar a 19- y 20-HEPE cuya función ha sido muy poco estudiada (Arnold *et al.*, 2010). Algunos de los HETEs formados por el CYP450 también pueden ser catalizados por la vía

de las COX, de manera que el 20-HETE es convertido por esta enzima en 20-OH PGH₂ (Arnold *et al.*, 2010).

- La oxidación bis-alílica del AA da lugar a la formación de 5-, 8-, 9-, 11-, 12- y 15-HETE (Hornsten *et al.*, 1997). Es interesante señalar, que aunque los HETEs son principalmente producidos a través de la vía de la LOX y del CYP450, también se pueden producir por la COX-1, como en el caso del 15-HETE (Thuresson *et al.*, 2000; Moreno, 2009). Los HETEs presentan esteroisómeros de manera que por la vía del CYP450 se sintetiza predominantemente las formas R, mientras que las LOXs generan mayoritariamente las formas S y a través de la oxidación no enzimática se generan mezclas racémicas (Bylund *et al.*, 1998). Los HETEs una vez formados, o bien se incorporan a los glicerofosfolípidos de las membranas celulares o son catalizados rápidamente por vía de las LOXs para producir ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DHETEs). Así, 12-HETE o 15-HETE son oxidados por la 5-LOX para producir 5,12-DHETE o 5,15-DHETE, respectivamente (Mancini *et al.*, 1998).
- Por último, la epoxidación del AA da lugar a ácidos 5,6-, 8,9-, 11,12- y 14,15-epoxieicosatrienoicos (EETs) (Capdevila *et al.*, 1990), mientras que la epoxidación del EPA origina ácidos 8,9-, 11,12-, 14,15- y 17,18-epoxieicosatetraenoicos (EETeTrs) (Arnold *et al.*, 2010). Los EETs se sintetizan principalmente en las células endoteliales pero también se producen en otros tipos de células como astrocitos, miocitos cardíacos y leucocitos (Alkayed *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997). Cada uno de estos cuatro regioisómeros en realidad puede presentarse en forma de dos estereoisómeros dado que el grupo epóxido se puede unir en cada uno de los dobles enlaces en dos diferentes configuraciones R y S, originando ocho EETs. La distribución enantiomérica de cada regioisómero producida por dos CYP distintas puede diferir notablemente (Zeldin, 2001; Spector y Norris, 2007). Los EETs, o bien forman parte de los glicerofosfolípidos de las membranas celulares o son metabolizados por una epóxido hidrolasa citosólica que los transforma en DHETEs (Natarajan y Reddy, 2003). Los 5,6- y 8,9-EETs también pueden ser oxidados por otras enzimas como las COXs originando análogos de la PGE₁ (epoxi-PGE₁) (Spector y Norris, 2007).

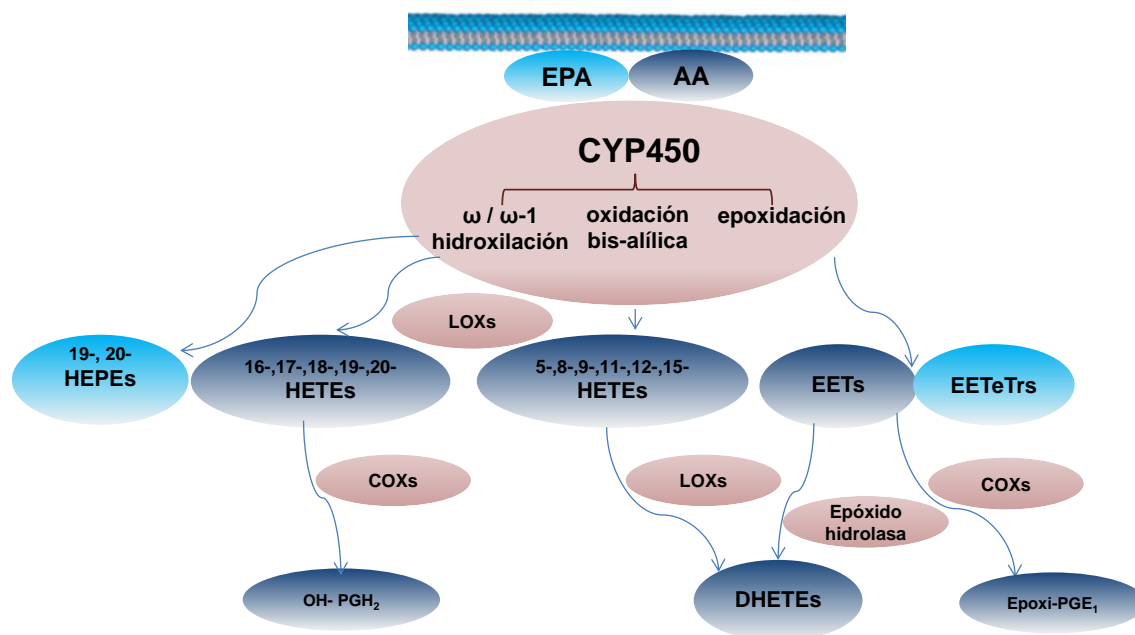


Figura 1.9. Principales eicosanoides producidos a partir del AA y del EPA por la vía del CYP450.

1.3. Receptores y señalización celular de los eicosanoides

Los eicosanoides interactúan mayoritariamente con receptores de la superficie celular que pertenecen a la subfamilia de receptores acoplados a proteína G de membrana (GPCRs) (Funk, 2001), aunque también pueden unirse a receptores nucleares como los PPAR. En la tabla 1.1 se muestran los agonistas y antagonistas más representativos de estos receptores.

1.3.1. Receptores y señalización celular de los prostanoides

Los prostanoides ejercen su actividad biológica de forma autocrina o paracrina mediante la interacción con sus receptores específicos (Coleman *et al.*, 1994; Narumiya, 1996). Se han secuenciado y clonado cuatro subtipos de receptores para las PGEs (EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄), uno para los TxAs (TP), dos para las PGDs (DP₁ y DP₂), uno para las PGFs (FP) y, finalmente, uno para las PGIs (IP) (Funk, 2001). Cada uno de estos receptores activa diferentes vías de señalización. Así, los receptores EP₂, EP₄, DP₁ e IP están asociados a la activación de proteínas Gs que provocan un aumento en la concentración intracelular de AMPc. EP₁, TP y FP se asocian a un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ mediado por la proteína Gq (Goetzl *et al.*, 1995). Los receptores

EP₃ y DP₂, este último también denominado CRTH₂ (molécula homóloga al receptor quimio-atrayente), modulan la actividad de la adenil ciclasa a través de la activación de proteínas Gi que provocan una disminución de los niveles de AMPc (Hirai *et al.*, 2001; Hata y Breyer, 2004; Harizi, 2013). Se ha descrito que DP₁, DP₂, EP₂ e IP tienen afinidades similares para las PGs correspondientes de las series 2 y 3 (Kiryama *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2011). En cambio, la afinidad relativa de los receptores EP₁, EP₃ y EP₄ para ambas series aún es motivo de controversia (Courtney *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2007; Hawcroft *et al.*, 2010).

1.3.2. Receptores y señalización celular de los leucotrienos y los ácidos hidroxieicosatetraenoicos y hidroxiocadaecenoicos

Los LTs también ejercen su acción biológica por activación de GPCRs. Hasta el momento se han clonado dos receptores para el LTB₄ y el LTB₅ (BLT₁ y BLT₂) y dos para los cis-LTs (Cis-LT₁R y Cis-LT₂R). BLT₁ está altamente expresado en leucocitos mientras que BLT₂ se expresa de forma más ubicua en los diferentes tejidos humanos. Se ha descrito que el LTB₄ presenta una afinidad mayor para los BLTs que el LTB₅ (Seya *et al.*, 1988; Yokomizo *et al.*, 2000; Moreno, 2009) y, además, el LTB₄ presenta mayor afinidad para BLT₁ que para BLT₂ (Yokomizo *et al.*, 2000). El LTC₄ y el LTD₄ pueden unirse al receptor Cis-LT₁R, clonado en 1999 (Lynch *et al.*, 1999), y al Cis-LT₂R, clonado en el año 2000 (Heise *et al.*, 2000). El LTD₄ presenta una mayor afinidad por el receptor Cis-LT₁R (Lynch *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2000; Öhd *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2007). Hasta el momento, no hay información sobre la interacción de LTC₅ y LTD₅ con estos receptores.

La información sobre los receptores para HETEs y HODEs es limitada. Aunque aún no ha sido clonado o caracterizado ningún receptor específico, es probable que existan receptores de superficie de membrana para los HETEs, al igual que los hay para PGs y LTs. Se ha descrito que el 12-S-HETE se puede unir al receptor nuclear esteroide coactivador-1 (SRC-1) (Kurahashi *et al.*, 2000) o a un GPCR sin especificar (Liu *et al.*, 1995; Hampson y Grimaldi, 2002) y más recientemente se ha propuesto que el 12-HETE se puede unir a GPR31, un receptor huérfano (Guo *et al.*, 2011). También cabe la posibilidad de que los HETEs realicen alguna de sus acciones sin la participación de receptores de membrana, ya que al ser sustancias lipofílicas pueden incorporarse directamente a la membrana uniéndose a moléculas efectoras como ADP-ribosiltransferasas (Li *et al.*, 1999), Ras (Muthalif *et al.*, 2001) o PKA (Imig *et al.*, 1999). Otros receptores a los que se pueden unir estos eicosanoides son los PPARs, receptores nucleares que actúan como factores de transcripción que se activan al unirse con su

ligando, adquiriendo la capacidad de reconocer secuencias específicas de determinados genes, principalmente genes implicados en el metabolismo lipídico, glucídico y en el proceso inflamatorio. Se han identificado tres subtipos de PPARs: PPAR α , PPAR δ y PPAR γ . El PPAR γ , que se expresa en adipocitos y células epiteliales, es activado por una gran variedad de ligandos lipofílicos, como el AA, el DHA, el EPA, el 15-HETE y el 9- y el 13-HODE (Willson *et al.*, 2000).

Tabla 1.1. Agonistas y antagonista de los receptores más representativos descritos para los eicosanoides

Receptor	Agonista	Antagonista
EP₁	PGE ₂ ~PGE ₃ >Carbaciolina >Iloprost	SC 19220 > ONO-8713
EP₂	PGE ₂ -PGE ₃ >ONO-AE1-259>Butaprost	AH6809
EP₃	Sulprostone> PGE ₂ >PGE ₃	L-798106
EP₄	PGE ₂ ~PGE ₃ >ONO-AE-329	AH 23848 >CJ-023423
DP₁	PGD ₂ >BW-245C	AH 6809>BW-A868C
DP₂	PGD ₂	BAY-u3405 (Ramatroban)
BLT₁	LTB ₄ > LTB ₅	LY293111>U 75302
BLT₂	CAY10583> LTB ₄ > LTB ₅	LY 255283~LY223982
SRC-1	12-HETE	
GPR31	12-HETE	
PPARγ	Pioglitazone >13-S-HODE> 9-S-HODE	GW 9662~ T0070907

Se incluye la afinidad comparativa de estos sustratos para cada receptor (~ similar, > mayor, < menor) de agonistas y antagonistas (Lawrence *et al.*, 1992; Steele *et al.*, 1999; Sugimoto y Narumiya, 2007; Jones *et al.*, 2009).

1.4. Efecto de los eicosanoides sobre la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en el cáncer colorrectal

Los eicosanoides son metabolitos que regulan importantes funciones fisiológicas. La diversidad de sus funciones viene determinada por la especificidad de cada receptor por los diferentes eicosanoides y por la distribución de dichos receptores en los diferentes tejidos. Estos metabolitos modulan el transporte de iones, la homeostasis vascular y pulmonar, la fisiología renal, la protección de la mucosa gástrica, la respuesta inflamatoria e inmunológica y el crecimiento celular (Funk, 2001). Como consecuencia pueden estar involucrados en importantes alteraciones patológicas, como asma, artritis reumatoide, aterosclerosis, hipertensión arterial, alteración de la mucosa gástrica y cáncer (Figura 1.10).

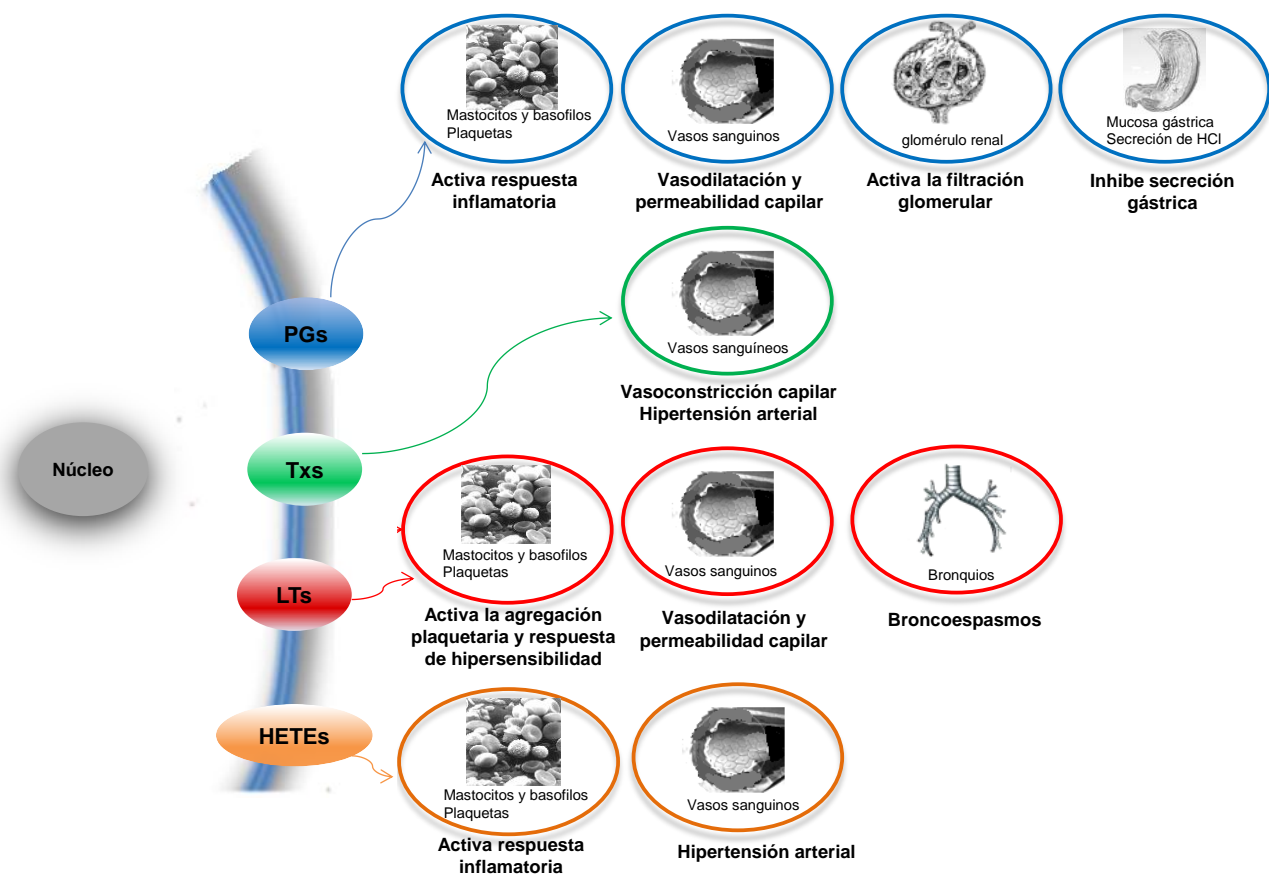


Figura 1.10. Efectos biológicos más relevantes de los eicosanoides. Las PGs, LTs y HETEs sintetizados por diferentes células, actúan en los procesos inflamatorios: activan la vasodilatación, aumentan la permeabilidad y potencian la acción de sustancias proinflamatorias. Participan en la génesis del edema y del dolor. Activan respuestas inmunitarias, como de hipersensibilidad y provocan hipertensión arterial. Finalmente los TxS son potentes vasoconstrictores.

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer cáncer más diagnosticado en hombres y el segundo en mujeres y, además, cada año se registran 1 millón de nuevos casos (Siegel *et al.*, 2012). Este tipo de cáncer tiene la cuarta tasa más alta de mortalidad y representa el 7,6% de las muertes relacionadas con el cáncer (Jemal *et al.*, 2011; World Cancer Report, 2014). En España el CRC es el cáncer que presenta una mayor incidencia en el conjunto de la población, un 15%, y presenta la segunda tasa de mortalidad más alta, un 13,7% (Sociedad Española de Oncología Médica, 2014).

El colon y el recto constituyen un tubo de 1,20 m de longitud tapizado por una monocapa epitelial que se invagina formando las criptas de Lieberkühn. Esta monocapa epitelial está formada por tres tipos de células diferenciadas: los colonocitos, las células caliciformes y las células enteroendocrinas, todas estas células proceden de células madre que residen en la parte inferior de la cripta. La renovación epitelial se produce en las criptas a través de una serie coordinada de procesos de proliferación, diferenciación y migración hacia el lumen intestinal. De esta manera, el gran número de células producidas al fondo de la cripta, se compensa con la apoptosis en el extremo de la cripta, en un proceso que requiere unos 3-4 días. El CRC se desarrolla de forma progresiva a través de una secuencia histológicamente bien definida como propuso Vogelstein *et al.* (1988). El proceso corresponde a una transición desde una hiperproliferación en la cripta, denominada foco de cripta aberrante (ACF) a la formación de pólipos o adenomas hasta evolucionar a CRC (Figura 1.11). El intervalo de tiempo estimado para la transformación maligna de la mucosa normal a partir de un adenoma en CRC es de 5-10 años (Vogelstein *et al.*, 1988). Este proceso se caracteriza por la acumulación de múltiples mutaciones que afectan al menos a tres mecanismos moleculares distintos: la inestabilidad cromosómica, impulsada en gran medida por eventos mutacionales que afectan a oncogenes y a genes supresores de tumores; la inestabilidad de microsatélites, que es activada por mutaciones en los genes de reparación del ADN; y la vía epigenética, que es impulsada en gran parte por el silenciamiento de genes supresores de tumores (Dixon *et al.*, 2013). En más de un 80% de los casos de CRC se aprecian mutaciones de genes que son claves en la regulación del ciclo celular como el oncogen K-Ras y los genes supresores de tumores TP53 y APC (*Adenomatous polyposi coli*) (Del Peso *et al.*, 1997; Junttila y Evans, 2009). Cada una de estas mutaciones confiere a las células del tumor una ventaja de crecimiento que trae como resultado la progresión del tumor. Así, el CRC comporta una disrupción de los mecanismos homeostáticos que regulan la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis (Fodde *et al.*, 2001; Hanahan y Weinberg, 2011).

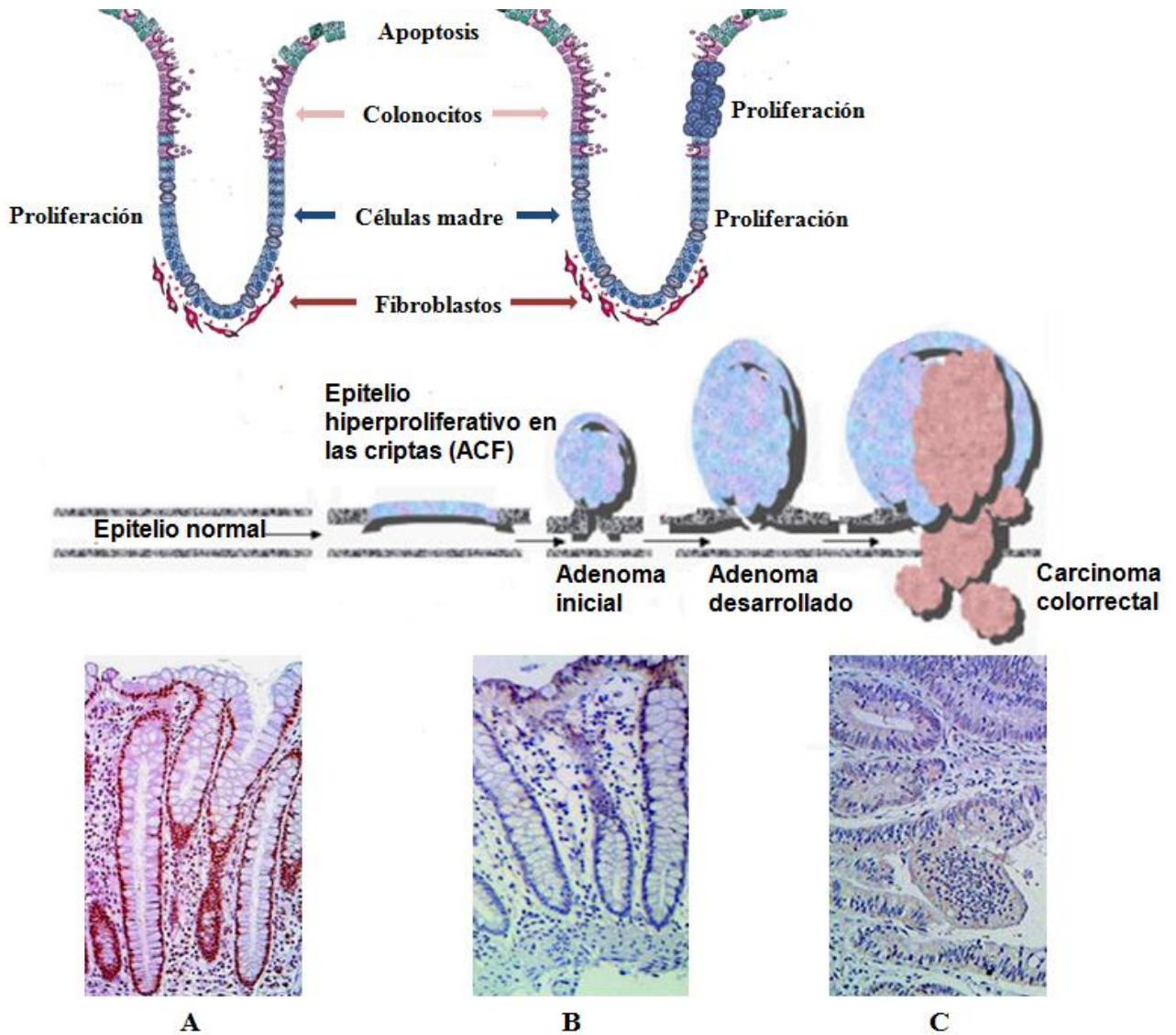


Figura 1.11. Etapas del desarrollo del CRC en las criptas de la mucosa de colon humano. La inmunotinción (rojo) señala genes reparadores de ADN y la hematoxilina (azul) marca la cromatina. A partir de un epitelio colónico normal (A) tras el incremento de la proliferación celular y disminución de la expresión de genes reparadores del ADN se desarrolla un adenoma inicial (B) que pueden evolucionar a un carcinoma (C) (adaptación de Peifer, 2002; Prasad *et al.*, 2014).

El CRC es una enfermedad heterogénea donde se han descrito tres formas principales: la hereditaria, la esporádica, y la desarrollada en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (Stigliano *et al.*, 2014). El CRC hereditario es debido a mutaciones heredadas en los genes responsables de la reparación de ADN y genes supresores de tumores y corresponde aproximadamente al 2-7% de todos los casos de CRC, siendo la poliposis adenomatosa familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposi*) y el CRC hereditario no polipósico (HNPCC, *Hereditary Non-Polyposic Colorectal Cancer*) los principales subtipos (Stigliano *et al.*, 2014). El CRC esporádico representa más

del 90% de todos los casos de CRC. Su causa es principalmente la inestabilidad cromosómica y se relaciona generalmente con la dieta, factores ambientales y envejecimiento. En este sentido, se ha sugerido que la menor incidencia de CRC en los países mediterráneos puede ser debida a su dieta tradicional rica en aceite de oliva, que aporta MUFAs y un consumo habitual de pescado que equilibra los PUFA ω -6 y ω -3 (Kushi *et al.*, 1995; Bamia *et al.*, 2013; Porenta *et al.*, 2013). La IBD, que incluye la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, se origina por una respuesta inmune anormal de la mucosa del colon y recto, dando lugar a un estado inflamatorio que en algunos casos puede evolucionar a CRC al potenciar la inestabilidad cromosómica (Stigliano *et al.*, 2014). La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn incrementan el riesgo de desarrollar CRC en un 18-20% y en un 8%, respectivamente (Eaden *et al.*, 2001; Canavan *et al.*, 2006).

1.4.1. Papel de la vía de las ciclooxigenasas en el cáncer colorrectal

En el 85% de los adenocarcinomas existe una sobreexpresión de COX-2 (Gupta y DuBois, 2001a; Wang y DuBois, 2010; Cathcart *et al.*, 2011) (Figura 1.12) y se considera que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) reducen el riesgo de CRC en un 40-50% (Peddareddigari *et al.*, 2011). Una evidencia directa de que la COX-2 juega un papel clave en el CRC se obtuvo a partir de estudios donde la ablación genética de ambas COXs reducían el desarrollo de pólipos colónicos, tanto en ratones APC^{Min/+}, un modelo de ratón que presenta una neoplasia intestinal múltiple debido a la mutación en el gen supresor de tumores APC (Moser *et al.*, 1995; Chulada *et al.*, 2000), como en ratones APC ^{Δ 716}, ratones que presentan otro tipo de mutación en el gen APC que da lugar a una neoplasia múltiple e invasiva (Oshima *et al.*, 1996). Además, en los ratones APC^{Min/+} se ha observado que los AINEs reducen el número de pólipos y su tamaño (Jacoby *et al.*, 2000).

A partir de los años 90 se estableció que inhibidores selectivos de la COX-2, como celecoxib o rofecoxib, podían reducir el riesgo de CRC y promover la regresión del tumor tanto en humanos como en modelos animales (Narko *et al.*, 1997; Muller-Deker *et al.*, 2002; Wang y DuBois, 2010). Los inhibidores no selectivos de las COXs, como el ácido acetilsalicílico, presentan un efecto anti-neoplásico similar aunque limitado por su intolerancia gastrointestinal (Dannenbergh y Howe, 2003). Actualmente, el celecoxib es el único AINE aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de los pólipos de colon y recto, y está recomendado básicamente para pacientes con poliposis adenomatosa familiar (Bombardier *et al.*, 2000). Pero, aunque el celecoxib no presenta los efectos adversos del uso prolongado de inhibidores no selectivos de la COX-2 como el sangrado

gastrointestinal y las nefropatías, su uso crónico se ha asociado a un mayor riesgo de toxicidad cardiovascular (Bombardier *et al.*, 2000; Bresalier *et al.*, 2005; Kearney *et al.*, 2006).

Por otra parte, existen estudios que correlacionan la pérdida de expresión de 15-PGDH, enzima que degrada las PGs, con la formación del CRC y otros tumores (Backlund *et al.*, 2005; Wang y DuBois, 2006). Es importante señalar que los AINEs sobreexpresan la 15-PGDH en las neoplasias colorrectales, de tal manera que su acción antiproliferativa podría ser debida no sólo a la inhibición de las COXs sino también a la activación de la 15-PGDH (Backlund *et al.*, 2005; Wang y DuBois, 2006).

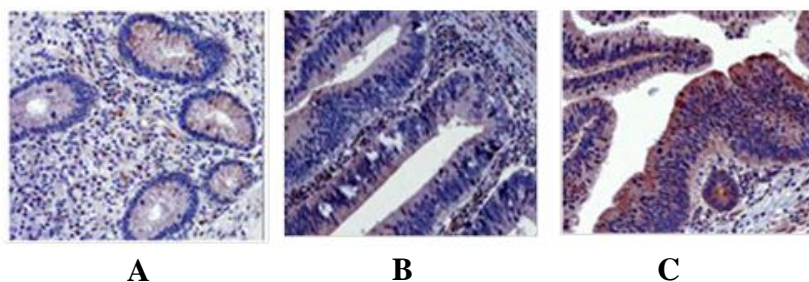


Figura 1.12. Expresión de la COX-2 en la mucosa de colon sana (A), en el adenoma inicial (B) y el CRC (C). La inmunotinción (rojo) señala la proteína COX-2 y la hematoxilina (azul) marca la cromatina y en el CRC (adaptación de Cathcart *et al.*, 2011).

1.4.2. Papel de la vía de las lipoxigenasas en el cáncer colorrectal

Aunque el papel de las LOXs en el desarrollo y progresión del CRC es complejo debido a la variedad de isoformas de la LOX (Shureiqi y Lippman, 2001; Catalano y Procopio, 2005). Se ha descrito que la 5-LOX y la 12-LOX están generalmente ausentes en tejido normal y se expresan en varios cánceres epiteliales y particularmente en el CRC (Gao *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004). En este sentido, se ha demostrado la correlación entre la expresión de estas enzimas y el aumento del tamaño de los pólipos, siendo más elevada la expresión de la 5-LOX en estadios iniciales y de la 12-LOX en estadios más avanzados del CRC (Melstrom *et al.*, 2008; Wasilewicz *et al.*, 2010; Cathart *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado la eficacia de inhibidores de la 5-LOX como el zileuton en el tratamiento de neoplasias de colon (Melstrom *et al.*, 2008). El uso de otros inhibidores está en investigación ya que sus propiedades anti-cancerígenas no se han establecido plenamente en estudios preclínicos. Por ejemplo, el MK886, inhibidor de la FLAP, reduce la proliferación y el crecimiento en líneas celulares y modelos experimentales de CRC (Cianchi *et al.*, 2006). Así mismo, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), inhibidor no específico de las LOXs, disminuye la síntesis de ADN en modelos celulares de

CRC (Galfi *et al.*, 2005). En cambio, se ha descrito que la 15-LOX-1 y la 15-LOX-2 se expresan en el tejido normal o al inicio de las lesiones, pero no en el CRC (Shureiqi *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de 15-LOX-1 reduce el crecimiento del tumor (Nixon *et al.*, 2004).

