

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Biologia Cel·lular

**Efecte de l'oli de peix i l'oli d'oliva en el desenvolupament del càncer colorectal**

Tesi presentada per **Elisenda Pons Pujol**

Director: **Dr. Xavier Llor Farré**  
CoDirector: **Dr. Miquel Àngel Gassull**  
Tutora: **Dra. Rosa Miró Ametller**

**Xavier llor Farré**, cap d'investigació dels grup d'Oncologia Digestiva del Hospital Germans Trias i Pujol, i **Miquel Àngel Gassull Duró**, Cap del Servei d' Aparell Digestiu del Hospital Germans Trias i Pujol, certifiquen que la Tesi titulada:

**Efecte de l'oli de peix i l'oli d'oliva en el desenvolupament del càncer colorectal**

ha sigut realitzada per **Elisenda Pons Pujol** sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de Doctora.

Dr. Xavier Llor Farré  
Director

Dr. M.A Gassull Duró  
CoDirector

Badalona, Febrer de 2006

**Al Jordi,  
la Joana i  
el Bru**

**A totes les persones que m'he anant trobant al llarg de la vida**

**A totes les persones que m'han ajudat amb el seus coneixements**

**A tots els malalts**

**A tots els amics que necessito i em necessiten**

**A les companyes de fatiga**

**A la família**

# **ÍNDEX**

<b>I. OBJECTIUS I DISSENY EXPERIMENTAL</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ</b>	<b>4</b>
<b>II.I. El càncer colorectal</b>	<b>5</b>
<b>II.II. Composició dels àcids grassos i dels olis</b>	<b>6</b>
<b>II.III. La diferenciació cel·lular</b>	<b>9</b>
<b>II.IV. Homeostasi del teixit epitelial</b>	<b>10</b>
<b>II.V. Paper de COX-2 en el càncer colorectal</b>	<b>13</b>
<b>II.VI. Influència dels àcids grassos en el càncer colorectal</b>	<b>15</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>18</b>
<b>ESTUDIS <i>IN VITRO</i></b>	<b>19</b>
<b>III.I. Cultius cel·lulars</b>	<b>19</b>
<b>III.II. Suplements dels cultius cel·lulars</b>	<b>19</b>
<b>III.III. Assaig d'incorporació de Timidina [<sup>3</sup>H]</b>	<b>20</b>
<b>III.IV. Estudis de diferenciació cel·lular</b>	<b>21</b>
<b>III.V. Determinació del grau d'apoptosi: Tinció amb DAPI</b>	<b>23</b>
<b>III.VI. Estudis d'expressió proteica</b>	<b>24</b>
<b>III.VII. Estudis d'expressió gènica</b>	<b>25</b>
<b>III.VIII. Determinació de l'apoptosi per citometria de flux</b>	<b>26</b>
<b>ESTUDIS <i>IN VIVO</i></b>	<b>27</b>
<b>III.IX. Inducció de carcinogènesi colorectal <i>in vivo</i></b>	<b>27</b>
<b>III. X. Determinació del grau d'apoptosi: TUNEL</b>	<b>28</b>

<b>ANÀLISI ESTADÍSTIC</b>	<b>29</b>
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>30</b>
<b>ESTUDIS <i>IN VITRO</i></b>	<b>31</b>
<b>IV.I. L'oli de peix, l'oli d'oliva indueixen la diferenciació de les cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal Caco-2</b>	<b>31</b>
<b>IV.II. L'oli de peix té un important efecte en la inhibició de la proliferació cel·lular</b>	<b>33</b>
<b>IV.III. Inducció de l'apoptosi per efecte dels diferents nutrients</b>	<b>35</b>
IV.III.I. Implicació dels diferents components de la família Bcl-2 en l'apoptosi	39
IV.III.I.a. Implicació de Bcl-2	39
IV.III.I.b. Implicació de Bcl-x <sub>L</sub>	41
IV.III.I.c. Implicació de Bax	41
IV.III.II. Implicació de COX-2 en l'apoptosi induïda pels àcid grassos n-3 i n-9	43
<b>ESTUDIS <i>IN VIVO</i></b>	<b>45</b>
IV.III.III. Efecte protector de l'oli de peix i d'oliva en la inducció de la carcinogènesi colorectal	45
<b>V. DISCUSSIÓ</b>	<b>48</b>
<b>VI. CONCLUSIONS</b>	<b>56</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>59</b>
<b>VIII. ABREVIATURES</b>	<b>67</b>

# **I. OBJECTIUS I DISSENY EXPERIMENTAL**



La hipòtesi principal del treball, aquí presentat, és:

**L'oli d'oliva i l'oli de peix són capaços de modular el desenvolupament del càncer colorectal.**

Aquesta hipòtesis l'hem subdividit en els següents objectius:

- A. Determinar l'efecte de l'oli d'oliva i l'oli de peix en la inducció de la diferenciació cel·lular en el càncer colorectal.
- B. Determinar l'efecte de l'oli d'oliva i de l'oli de peix en la inhibició de la proliferació cel·lular en el càncer colorectal.
- C. Determinar l'efecte de l'oli d'oliva i de l'oli de peix en la inducció de l'apoptosi cel·lular en el càncer colorectal.
- D. Determinar el paper dels àcids grassos en els efectes produïts pels olis.

## **Disseny experimental**

Per respondre els diferents objectius s'han plantejat els següents estudis:

### Estudis *in vitro*

Objectiu A i D:

Estudis de diferenciació cel·lular. Determinar el grau d'expressió de diferents marcadors de diferenciació en línies d'adenocarcinoma colorectal humà.

Objectiu B i D:

Estudis de proliferació cel·lular. Determinar el grau de proliferació cel·lular mitjançant la incorporació de timidina en línies d'adenocarcinoma colorectal humà.

Objectiu C i D:

Estudis d'apoptosi cel·lular. Determinació de canvis morfològics indicadors de l'apoptosi. Estudis dels gens implicats en aquesta apoptosi a nivell de RNA i de proteïna.

### Estudis *in vivo*

Objectiu C:

Estudis d'apoptosi cel·lular. Determinació del grau d'apoptosi en el còlon de rates tractades amb azoximetà.

## **II. INTRODUCCIÓ**

## **II.I. El càncer colorectal**

El càncer colorectal és la segona causa de mort per càncer en l'hemisferi oest<sup>1-3</sup>. Importants diferències regionals tant en la incidència com en la mortalitat<sup>4</sup>, ràpids augments en el nombre de casos en diferents nacions<sup>5</sup>, i l'adaptació de poblacions immigrants a la incidència dels països d'acollida<sup>6</sup>, suggereixen que el desenvolupament del càncer colorectal és el resultat d'una estreta interrelació entre factors genètics i mediambientals. Dels factors mediambientals, la dieta i l'estil de vida semblen estar entre els més importants<sup>7-9</sup>. Així, mentre que la carn vermella, la grassa saturada i el greix animal, els hidrats de carboni refinats, l'alcohol i una elevada ingesta energètica semblen afavorir el desenvolupament del càncer colorectal; la fibra dietètica, la fruita, els vegetals, el calci, el folat, i les vitamines antioxidants podrien estar associades a una disminució del risc de desenvolupar aquest tipus de càncer.

En la progressió del càncer colorectal es produeix una sèrie de estadis clínics i histopatològics que van des de lesions úniques a la cripta passant per petits tumors benignes (anomenats pòlips adenomatosos) fins als càncers malignes (anomenats carcinomes)<sup>10</sup>.

La carcinogènesis colorectal es caracteritza per la successiva acumulació de mutacions en gens determinants en el control del creixement i la diferenciació de les cèl·lules epitelials. La inestabilitat genòmica (que descriu condicions que perpetuen una àmplia i repartida pèrdua de integritat del DNA) és bàsica en la progressió de la carcinogènesis colorectal.

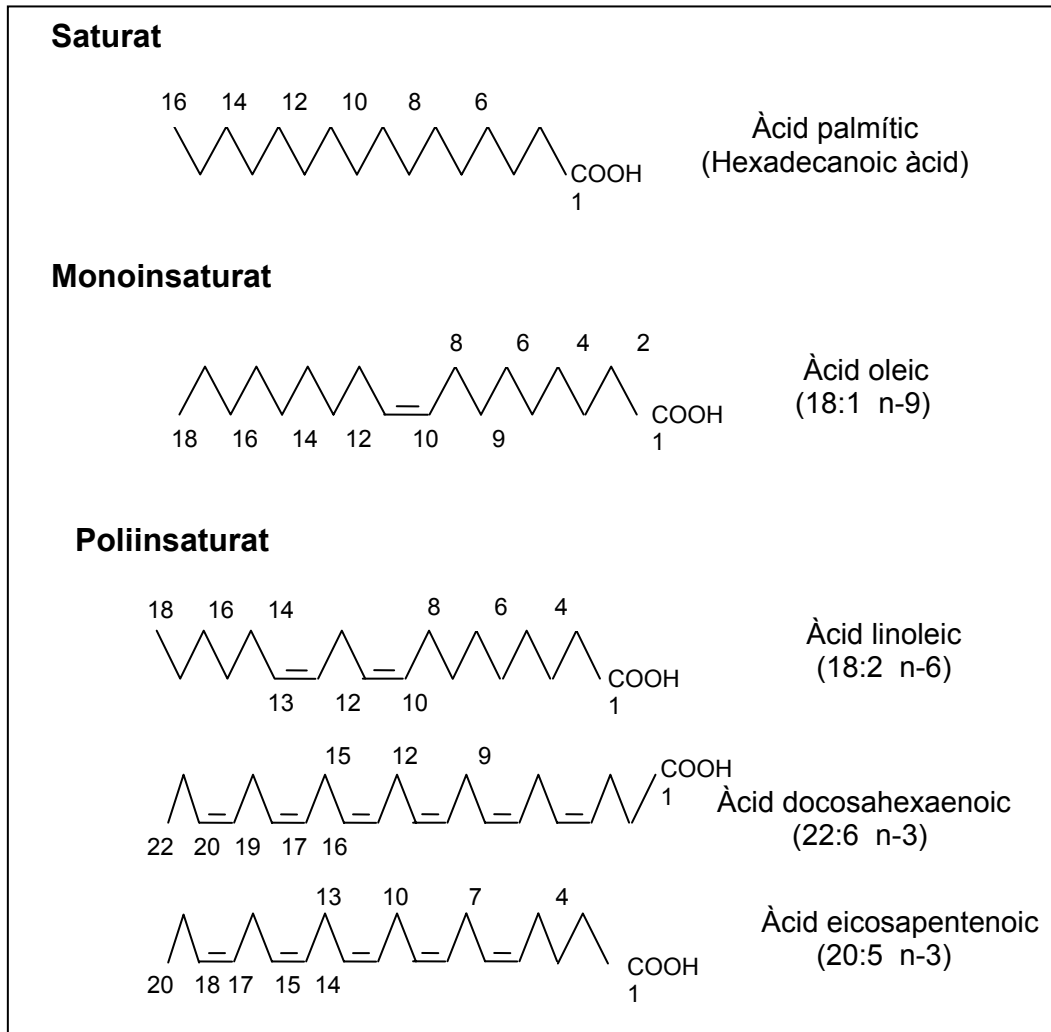
Fins al moment s'han identificat dues vies principals, aparentment independents, d'inestabilitat genòmica<sup>11, 12</sup>. La primera, i més comú, es caracteritza per la inactivació seqüencial de gens onco-supressors com *APC*, *p53*, *DCC*, *SMAD2* y *SMAD4*. Els tumors que es generen a través d'aquesta via, anomenada via supressora, mostren inestabilitat cromosòmica (Chromosomal INstability-CIN) amb freqüents anomalies

citogenètiques i pèrdues al·lèliques<sup>13</sup>. Les alteracions d'aquesta via expliquen aproximadament el 85% dels càncers colorectals. L'esdeveniment genètic més primerenc i prevalent identificat, és la inactivació bial·lèlica per mutacions del gen Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) que causa l'aparició de pòlips i segueix amb mutacions activadores de l'oncogen *K-ras* en el adenoma avançat així com una acumulació d'alteracions de *DCC*, etc. que culminen amb una mutació bial·lèlica inactivadora de *p53* durant la transició a malignitat. El paradigma d'aquesta via el constituïria el Síndrome de la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) que és degut a alteracions de la línia germinal del gen *APC*. La segona via, anomenada via mutadora, presenta una inestabilitat de microsatèl·lits (Micro Satellite Instability-MSI) àmplia i general i es caracteritza per una acumulació de alteracions somàtiques al llarg de seqüències simples i repetitives (microsatèl·lits). Algunes d'aquestes alteracions es presenten en regions codificadores de gens implicats en la progressió tumoral, como són *TGFβRII*, *IGFIIR*, *hMSH3*, *hMSH6*, y *BAX*<sup>14-17</sup>. La inestabilitat de microsatèl·lits és el resultat de mutacions<sup>18</sup> o metilacions de zones promotores de gens reparadors del DNA<sup>11</sup> (mismatch repair genes o MMR). Les mutacions de la línia germinal d'aquests gens constitueixen la base dels pacients amb el síndrome de Lynch, que representen entre el 2-3% aproximadament dels càncers colorectals.

## **II.II. Composició dels àcids grassos i dels olis**

Els àcids grassos estan formats per una cadena d'hidrats de carboni i per un grup carboxil terminal. Els àcids grassos més comuns tenen entre 12 i 22 àtoms de carboni (C12-C22). Quan cada un dels àtoms de carboni, exceptuant els dos terminals, estan units a dos àtoms d'hidrogen, a aquests àcids se'ls anomena saturats. Quan dos àtoms de carboni adjacents únicament estan units a un àtom d'hidrogen cada un, entre els carbonis es forma un enllaç doble. Aquests àcids grassos s'anomenen insaturats. Si la cadena conté un únic doble enllaç, parlarem d'àcids

grassos monoinsaturats (MUFA) i si la cadena conté més d'un doble enllaç seran àcids grassos poliinsaturats (PUFA)<sup>19</sup> (figura 1).



**Figura 1:** Estructura química dels àcids grassos

Els àcids grassos saturats, així com la majoria dels àcids grassos monoinsaturats, poden ser sintetitzats en diferents teixits del cos a partir de precursors no grassos, com la glucosa o els aminoàcids. En les persones que ingereixen una dieta occidental amb un elevat contingut en grassa, aquesta síntesi d'àcids grassos és mínima o inexistent. Per altra banda, els mamífers no són capaços de sintetitzar l'àcid linoleic (18:2n-6)

ni l'alfalinolenic (18:3n-3) i és per aquest motiu que aquests àcids grassos poliinsaturats s'anomenen àcids grassos essencials.

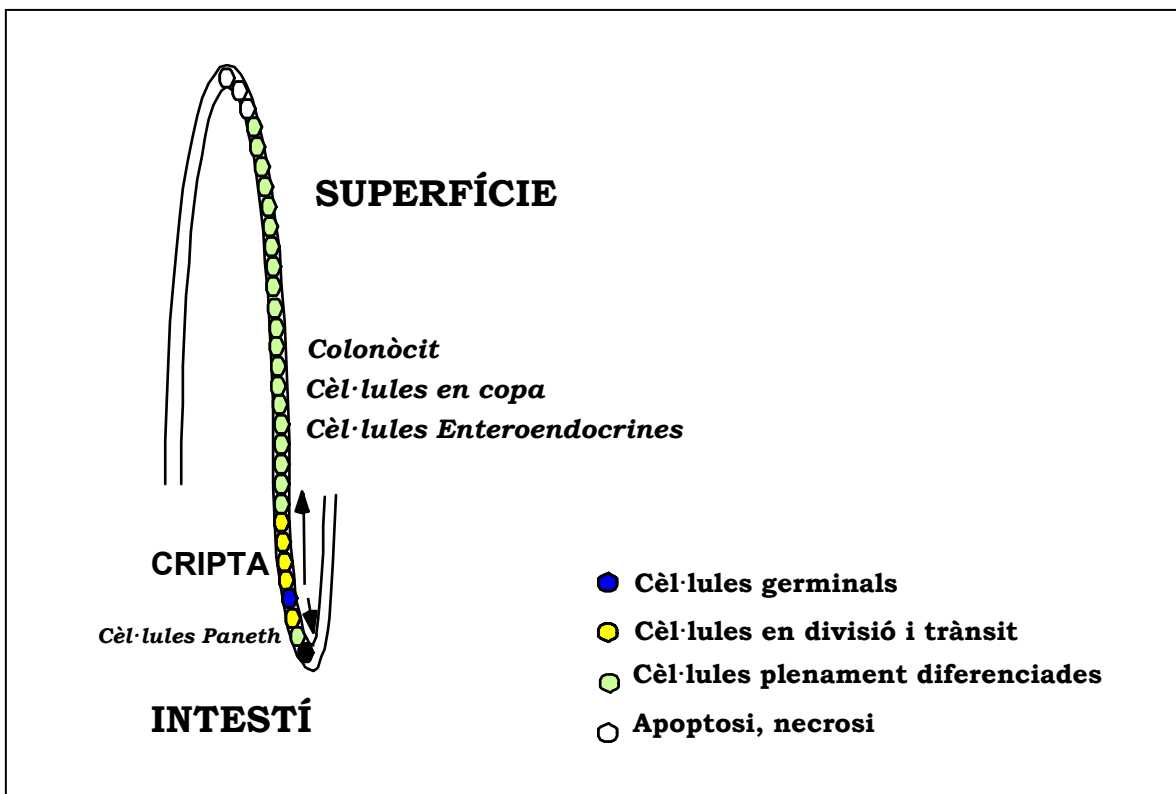
La ingesta de l'àcid oleic (18:1n-9) suposa aproximadament entre el 8 i el 15 % de la energia de la dieta occidental. L'aportació energètica de l'àcid linoleic és del 7-8 % mentre que la de l'alfalinolenic és del 0.3-0.4%<sup>20</sup>. Un cop ingerits, aquests àcids grassos de 18 carbonis són desaturats i elongats a àcids de 20 carbonis. Així, l'àcid oleic serà convertit a àcid eucosatrienoic (ETA), el linoleic a àcid araquidònic i l'alfalinolenic a eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA) i docosapentaenoic<sup>21</sup>. Degut a la poca ingesta de l'alfalinolenic a la nostra societat, la major aportació d'EPA i de DHA prové directament del consum de peix ric en aquests àcids, com la tonyina i les sardines.

Els diferents olis de peix varien la seva composició segons l'espècie de on s'han obtingut. Però tots tenen com a característica comú un contingut significativament més alt en àcids grassos de la família n-3 amb 20 o més carbonis que els olis procedents de mamífers i d'aus. Els suplementos nutricionals d'oli de peix comercials contenen aproximadament un 18% d'EPA i un 12% de DHA.

La composició de l'oli d'oliva consta d'un 99.02 % d'àcids grassos, 0.04% d'aigua i de 0.04% d'hidrats de carboni. Les quantitats de greixos i components d'aquest oli depenen de les diferents varietats d'olives així com de la maduresa, del tipus de sòl i de la humitat. En general, els valors mitjans de la composició dels àcids grassos són: Àcids grassos saturats 16% (Míric, Palmític, Esteàric i Arcaic), àcids grassos monoinsaturats 72% (Palmitoleic, Oleic), àcids grassos poliinsaturats 12% (Linoleics, Linolènics).

### **II.III. La diferenciació cel·lular**

La diferenciació cel·lular és un procés complex associat a la sortida del cicle cel·lular i l'entrada a unes vies alternatives on la cèl·lula desenvoluparà unes funcions molt més especialitzades<sup>22</sup>. En el còlon, tal i com passa a l'intestí prim, les cèl·lules epitelials s'originen a partir de cèl·lules mare localitzades a la base de la cripta. Aquestes cèl·lules migraran de la zona proliferativa cap a les zones apicals mentre es van diferenciant (figura 2).



**Figura 2:** Morfologia de la cripta colònica

Per estudiar les funcions dels enterocits intestinals, la utilització de cultius cel·lulars de la línia cel·lular d'adenocarcinoma colorectal Caco-2 han esdevingut un bon model, ja que aquest tipus de cèl·lules tenen la capacitat d'expressar nivells relativament alts d'enzims característics de les microvellositats ("brush-borders") intestinals<sup>23</sup>. Morfològicament les



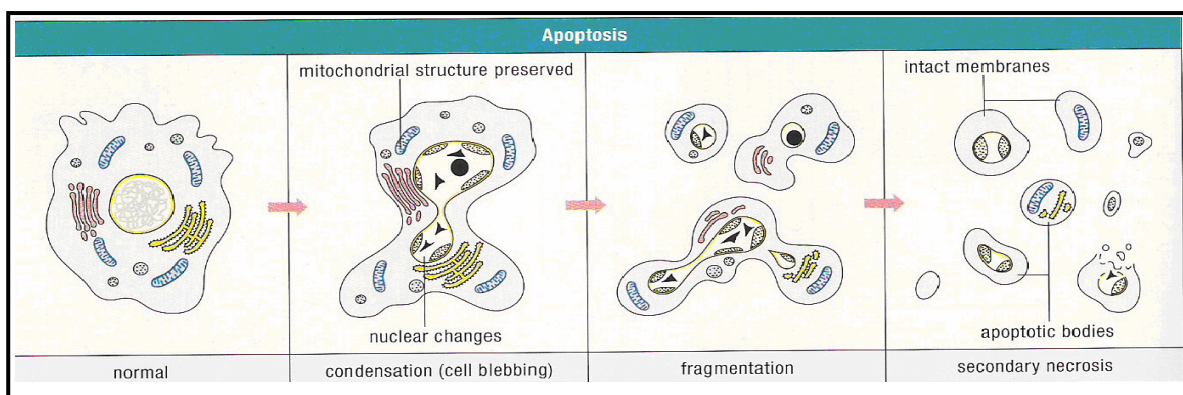
cèl·lules Caco-2 es diferencien formant columnes cel·lulars polaritzades unides per unions adherents (“tight junctions”) amb un microvil·li ben desenvolupat a la seva membrana apical. La diferenciació de les cèl·lules Caco-2 per efecte del contacte, provoca la pèrdua de la seva capacitat proliferativa i l’expressió d’enzims característics de l’intestí prim com la Sucrasa-Isomaltasa (S-I) i la Dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV).

#### **II.IV. Homeostasi del teixit epitelial**

La constant renovació de l’epiteli colònic depèn d’un equilibri estretament regulat entre la pèrdua cel·lular deguda a l’apoptosi o mort cel·lular programada i la generació de noves cèl·lules<sup>24</sup>. L’alteració d’aquesta homeostasi produiria el desenvolupament de tumors colorectals. Una acumulació de cèl·lules, degut a un augment del grau de proliferació o a un defecte en l’apoptosi, seria la base del desenvolupament d’aquests tumors<sup>25, 26</sup>. De fet, els adenomes colorectals tenen un grau de proliferació més elevat que el de la mucosa normal, i aquest augmenta en la progressió d’adenoma a carcinoma. Al mateix temps, mentre que en adenomes el grau d’apoptosi és clarament superior al del teixit normal, en el carcinoma establert aquest és inferior al de l’adenoma. Els carcinomes colorectals presenten un índex elevat de proliferació al mateix temps que presenten una atenuació en l’apoptosi, fet que provoca que hi hagi un desequilibri en la balança entre el guany i la pèrdua cel·lular provocant el creixement net del tumor<sup>27</sup>.

L’apoptosi és un procés essencial en la regulació del nombre de cèl·lules epitelials. És un mecanisme crucial per prevenir que cèl·lules danyades o mutades sobrevisquin i es divideixin, provocant un augment del nombre de cèl·lules mutades, les quals, acabarien contribuint en el procés de la carcinogènesi colorectal. L’apoptosi és una forma de mort cel·lular que succeeix en condicions fisiològiques normals, la cèl·lula participa activament en la seva destrucció.

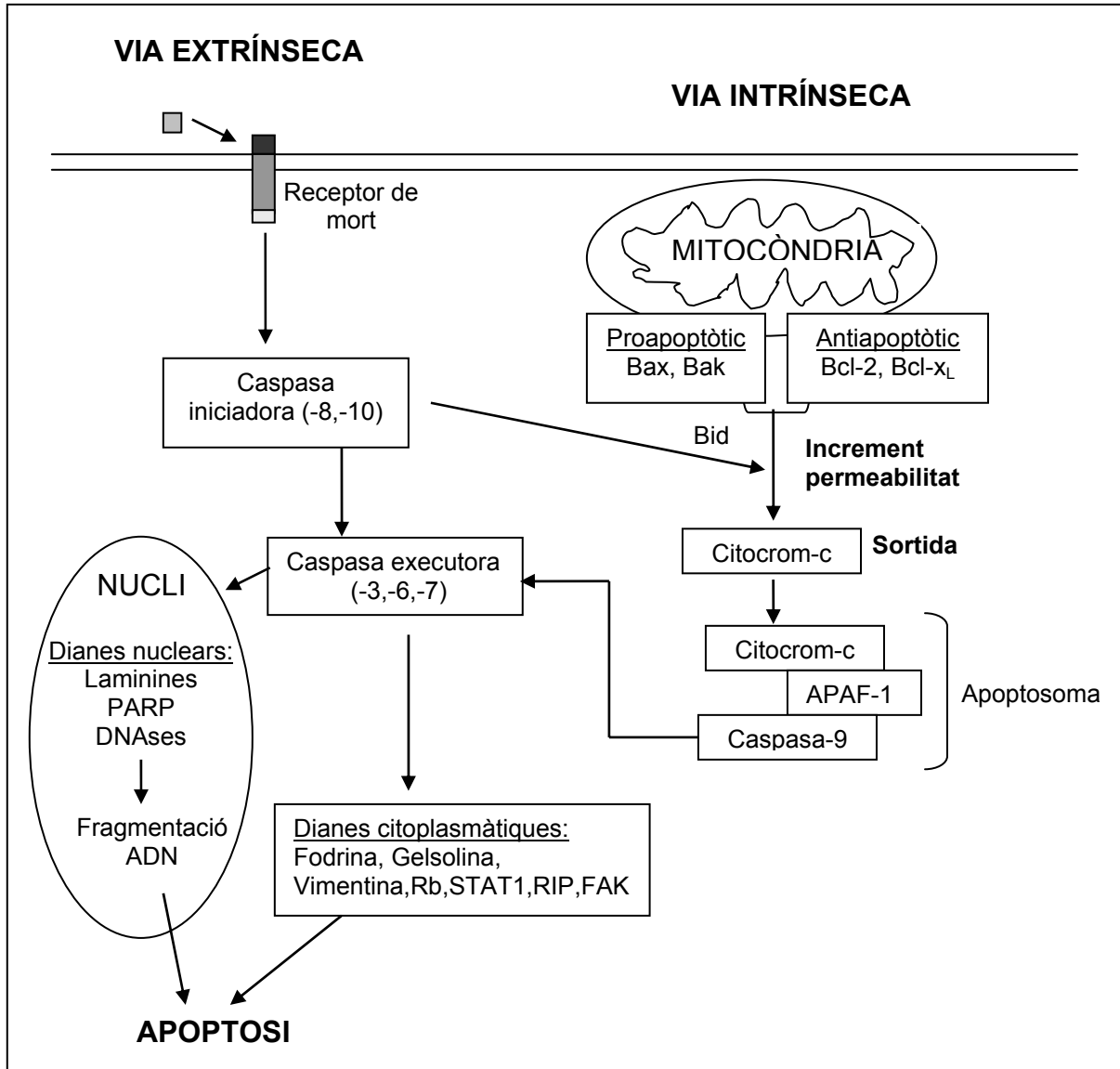
Una cèl·lula en apoptosi presenta unes característiques morfològiques i bioquímiques específiques. Aquestes inclouen agregació de la cromatina, condensació nuclear i citoplasmàtica, partició del citoplasma i del nucli en petites vesícules de membrana (cossos apoptòtics). Els cossos apoptòtics contenen ribosomes, mitocondris i material nuclear morfològicament intactes (figura 3). *In vivo*, els cossos apoptòtics són fagocitats ràpidament pels macròfags o per cèl·lules epitelials adjacents sense provocar cap tipus de resposta inflamatòria.



**Figura 3:** Il·lustració de les característiques morfològiques de l'apoptosi (Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods, Boehringer Mannheim)

S'han descrit dues vies principals d'activació dels processos apoptòtics: la via del receptor de mort cel·lular o via extrínseca, activada per la unió de certs factors de mort ( $\text{TNF-}\alpha$ , Fas lligant, TRAIL) al receptors de mort de la membrana plasmàtica i la via de la mitocondria o via intrínseca activada per diferents estímuls<sup>28, 29</sup>.

L'activació d'aquestes dues vies d'apoptosi provoca una sèrie de processos moleculars i bioquímics que culminen en un mecanisme comú. Aquest consisteix en l'activació d'un sistema proteolític que involucra la família de proteases anomenades caspases. Aquests enzims participen en una cascada que finalitza amb el tall de diferents substrats claus de l'interior de la cèl·lula provocant la desintegració d'aquesta (figura 4).



**Figura 4:** Esquema de les vies apoptòtiques

La via de la mitocondria es caracteritza per la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (PMME). Aquest mecanisme permet que les proteïnes segrestades a l'espai intermembrana, entre la membrana mitocondrial interna i l'externa, siguin alliberades al citosol provocant l'apoptosi. La via mitocondrial està regulada tant en processos anteriors com posteriors a la PMME.

Abans de la permeabilització de la membrana mitocondrial trobem involucrats els membres de la família de Bcl-2, dividits entre els antiapoptòtics (prevenen PMME) i els proapoptòtics (promouen la PMME).

Aquestes proteïnes estan formades per quatre dominis (BH1, BH2, BH3 i BH4). Les proteïnes proapoptòtiques amb múltiples dominis Bax i Bak, semblen ser un requisit per la PMME, formant directament obertures de mida indeterminada a la membrana mitocondrial externa<sup>30</sup>. Ambdues proteïnes, en la majoria de cèl·lules, estan en la forma no funcional i la seva activació està desencadenada per altres proteïnes, incloent un grup de proteïnes “BH3-only” (proteïnes de la família de Bcl-2 que únicament estan formades pel domini BH3) com per exemple Bid. Aquesta activació, actualment encara poc coneguda, està inhibida per les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2, Bcl-2 i Bcl<sub>xL</sub>, les quals segresten les proteïnes activadores<sup>30</sup>.

El balanç entre les proteïnes proapoptòtiques i antiapoptòtiques d'aquesta família és el responsable de la permeabilitat mitocondrial que permet l'alliberació del citocrom-c. Un cop al citosol, el citocrom-c s'uneix i activa Apaf-1 (“apoptosi activating factor”) i junts s'uneixen i activen la procaspasa-9 formant un complex anomenat apoptosoma. La caspasa 9 activa pot tallar i activar la caspasa executora 3, proteïna que acaba desencadenant el procés apoptòtic.

En la via extrínseca, un cop unit el lligant al receptor, aquest s'uneix a proteïnes adaptadores amb dominis citosòlics capaços d'unir-se a la caspasa iniciadora 8. La caspasa 8 acaba activant la caspasa 3 desencadenant l'apoptosi. Per altra banda, la caspasa 8 actua sobre la proteïna Bid tallant-la i originant la forma tBid. Aquesta proteïna tallada interrelaciona les dues vies activant la proteïna proapoptòtica Bax<sup>31</sup>.

## **II.V. Paper de COX-2 en el càncer colorectal**

La cicloxigenasa (COX) és un enzim imprescindible que catalitza un punt clau de la formació de les prostaglandines. Hi ha descrits dos isoenzims principals de COX: COX-1 i COX-2. COX-1 és considerat el gen

“housekeeping” de la biosíntesi de prostaglandines el qual s’expressa constitutivament en la majoria dels teixits del cos. COX-2 normalment no s’expressa en la majoria de teixits però és induït per efecte de diferents estímuls. COX-2 pertany a una classe de gens coneguts com “gens d’acció immediata” ja que en resposta a factors de creixement, citocines i promotors tumorals s’expressen de forma ràpida i transitòria<sup>32</sup>.

Eberhart *et al* van documentar per primer cop una sobreexpressió de COX-2 en el 85% dels carcinomes colorectals i aproximadament en un 50% dels adenomes colorectals. En canvi, en aquestes mateixes mostres, l’expressió de COX-1 no variava entre la mucosa normal i el carcinoma<sup>33</sup>. Per altra banda, COX-2 pot facilitar la progressió del càncer colorectal mitjançant l’estímul de la proliferació i la supervivència cel·lular<sup>34</sup>, la invasivitat tumoral<sup>35</sup>, i la producció d’agents angiogènics en cèl·lules de càncer colorectal<sup>36</sup>.

Hi ha diverses evidències clíniques que demostren una reducció del risc de càncer de còlon en aquells individus que reben inhibidors de COX. L’evidència més destacada van ser uns estudis realitzats amb pacients amb FAP (poliposi adenomatosa familiar) que rebien sulindac. Es va demostrar que aquests pacients reduïen substancialment la mida i el nombre dels pòlips colònics i que aquesta tendència es revertia quan es finalitzava el tractament<sup>37-39</sup>. En diferents models animals, utilitzats per l’estudi del càncer colorectal, com el del ratolí *Apc<sup>Min</sup>*, ratolí knock-out *Apc<sup>Δ716</sup>* i el de rates tractades amb azoximetà, s’ha demostrat que la utilització inhibidors específics de COX-2 així com de generals tenen un potent efecte supressor del creixement cel·lular del càncer colorectal<sup>40-42</sup>.

S’ha observat que la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), producte de COX-2, té efectes procarcinogènics. En cèl·lules de càncer colorectal humanes, el tractament amb  $PGE_2$  provoca un increment en els nivells de Bcl-2 i una reducció en els índex apoptòtics<sup>34</sup>. En cèl·lules epitelials de l’intestí de rata manipulades per sobreexpressar COX2, s’observa una important expressió de la proteïna Bcl-2 i una forta resistència a la mort per apoptosi induïda pel tractament amb butirat (àcid gras de cadena curta)<sup>43</sup>. Aquestes dades

suggereixen una interacció entre COX-2 i Bcl-2 pel control de la supervivència cel·lular.

## **II.VI. Influència dels àcids grassos en el càncer colorectal**

Actualment la naturalesa i l'extensió en la relació entre el càncer colorectal i cada nutrient específic està per definir. Dins dels diferents nutrients que afavoririen el desenvolupament del càncer colorectal, el greix sembla ser un dels components dietètics més determinant. De fet, d'acord amb multitud d'estudis cas-control, epidemiològics i experimentals, l'associació entre la grassa saturada i la animal amb el càncer colorectal sembla bastant sòlida<sup>44, 45</sup>.

Per altra banda, els àcids grassos no saturats semblen tenir efectes clarament diferents. Així doncs, hi ha estudis que suggereixen que el tipus d'àcid gras és més decisiu en el risc de desenvolupar càncer colorectal que la quantitat total de grassa consumida<sup>45, 46</sup>.

Mentre que estudis cas-control i de cohorts prospectius no han pogut demostrar una associació consistent entre la ingesta dels àcids grassos poliinsaturats n-6, com l'àcid linoleic (C18:2), i un major risc de càncer colorectal, alguns estudis experimentals suggereixen una associació significativa, particularment en els estadis postiniciació i promoció<sup>47-50</sup>.

L'àcid linoleic és l'àcid gras més consumit als E.E.U.U. i en algunes parts de Europa, on la incidència de càncer colorectal està entre les més altes del món<sup>4</sup>. Aquest relativament elevat consum de l'àcid linoleic en aquestes regions es produeix a expenses d'altres àcids grassos del tipus n-3 i n-9. Per altra banda, encara que en algunes zones com les regions mediterrànies i com Groenlàndia i Finlàndia tenen dietes amb un alt contingut en grasses, la incidència del càncer colorectal es manté relativament baixa<sup>3, 51</sup>. Una important diferència dietètica entre les regions mencionades i la resta dels països occidentals, és l'elevat consum de peix i oli de peix en les països nòrdics<sup>52</sup> i d'oli d'oliva i peix en els països de la conca mediterrània <sup>53-55</sup>.

Alguns estudis epidemiològics i de cas-control han mostrat un efecte protector dels àcids grassos n-3 sobre el desenvolupament del càncer i per aquest motiu han recomanat modificar la dieta i substituir el màxim possible les carns riques en greix per peix <sup>56, 57</sup>. En models animals també s'ha documentat un efecte protector d'aquests àcids grassos. En rates tractades amb azoximetà, una dieta rica amb oli de peix provocava un increment en l'apoptosi i en la diferenciació cel·lular, efectes no observats en rates que havien rebut una dieta rica en blat de moro (majoritàriament n-6)<sup>46</sup>. Aquesta protecció va ser detectada tant en l'estadi d'inici com en el de promoció de la carcinogènesi colorectal<sup>50</sup>.

Alguns dels potencials mecanismes pels quals l'oli de peix podria exercir el seu efecte protector comencen a ser dilucidats. L'oli de peix indueix l'apoptosi i disminueix la mitosi i la proliferació cel·lular en rates tractades amb carcinogen<sup>58</sup>. Aquests mateixos efectes s'han observat en rates sanes que rebien dietes riques en àcids grassos n-3 (EPA i DHA) i en voluntaris sans que van ingerir suplementos orals d'oli de peix<sup>59</sup>. Aquestes observacions podrien indicar la gran importància d'aquests àcids grassos com agents preventius del càncer colorectal<sup>60</sup>. L'àcid eicosapentaenoic sembla activar inhibidors de cinases ciclina-depenents com p21 (waf1/cip1), p27, p57, p19 i proteïnes específiques d'aturada del creixement en línies cel·lulars de càncer colorectal<sup>61</sup>.

Encara que molt menys estudiat, alguns estudis han suggerit un efecte potencialment protector de l'oli d'oliva sobre el desenvolupament del càncer colorectal. Així, un estudi ecològic que va utilitzar bases de dades de 28 països de tot el món<sup>62</sup>, i un estudi cas-control realitzat al sud d'Europa<sup>63</sup>, avalarien aquesta hipòtesis. En un model animal d'inducció de càncer colorectal per Azoximetà, dietes amb un contingut molt elevat de grassa en forma d'oli d'oliva no van tenir un efecte promotor de tumors<sup>64</sup>. En un estudi realitzat en el nostre grup, vam poder observar que tot i administrar una dieta amb quantitats molt menors de grassa (5% d'aportació lipídica), les rates que van rebre oli d'oliva com a principal aportació de grassa, van desenvolupar molt menys tumors que les rates que van ser alimentades amb oli de càmbar (ric en àcid linoleic)<sup>65</sup>. En el

mateix estudi s'observà una disminució de la formació de focus de criptes aberrants, suposadament precursors dels tumors colorectals, tant en els animals que van rebre oli d'oliva com oli de peix<sup>65</sup>.

Tot i ser l'àcid oleic (C18:1, n-9) el component més abundant de l'oli d'oliva, aquest conté altres substàncies que han estat identificades com a possibles agents quimiopreventius: alfa-tocoferols, esqualè i antioxidants. No és del tot clara la implicació de l'àcid oleic en el desenvolupament del càncer colorectal. Hi ha algun estudi que va observar un potent efecte inhibidor del creixement cel·lular en les cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal HT-29 per part de l'oli d'oliva. Aquest efecte era molt menor quan s'administrava àcid oleic<sup>66</sup>. També s'ha observat que l'àcid oleic té capacitat d'inhibir la formació de metàstasi pulmonars desenvolupades després d'implantar cèl·lules Co26Lu en ratolins<sup>67</sup>.



### **III. MATERIALS I MÈTODES**

## **ESTUDIS IN VITRO**

### **III.I. Cultius cel·lulars**

En els diferents experiments realitzats s'utilitzen dues línies d'adenocarcinoma colorectal humà: Caco-2 i HT-29. Ambdues línies cel·lulars tenen la capacitat de diferenciar-se quan estan sotmeses a diferents condicions, per exemple les cèl·lules Caco-2 es diferencien per contacte i les HT-29 per manca de glucosa al medi.

Els medi de cultiu per les cèl·lules Caco-2 consta de volums iguals de Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) i F12 (HAM) amb un 20% de sèrum fetal boví (FBS), 1% d'aminoàcids no essencials, 100 U/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina (Biological Industries Co., Beit Haemek, Israel). En el cas de les cèl·lules HT-29, aquest està format per DMEM amb un 10% de FBS, 1% d'aminoàcids no essencials, 100 U/mL de penicil·lina i 100 µg/mL d'estreptomicina (Biological Industries Co., Beit Haemek, Israel). Els cultius cel·lulars creixen en un incubador a 37°C amb un 5% CO<sub>2</sub> i humidificat.

### **III.II. Suplements dels cultius cel·lulars**

Els diferents suplements utilitzats són: oli de peix, la composició del qual és majoritàriament els àcids grassos n-3 poliinsaturats eicosapentanoic (EPA) i docosaheptaenoic (DHA) (Scientific Hospital Supplies International Limited, Liverpool. UK); oli d'oliva, del qual un 70% és àcid oleic; àcid gras n-9 (Aceites Borges Pont, SA, Tàrrega, Espanya); etanol absolut; àcid oleic-BSA (complexat amb albúmina); àcid linoleic-BSA i albúmina lliure d'àcid grassos (BSA) (Sigma Aldrich, St Louis, MO). DHA, EPA, àcid linoleic (LA) i àcid oleic (OA) dissolt amb etanol (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI).

L'oli de peix i l'oli d'oliva s'emulsionen amb etanol del 95% i es dilueixen en tampó fosfat salí (PBS) fent que la concentració final d' etanol que reben les cèl·lules sempre sigui inferior al 0.2%. Les cèl·lules suplementades amb control reben la mateixa concentració d' etanol diluït amb PBS. Les dilucions de treball es mantenen a 4° C. Per tractar les cèl·lules, es fa un vòrtex de les dilucions durant 10 segons i immediatament es dispensen sobre els cultius.

En el cas dels estudis amb àcids grassos complexats amb albúmina, s'utilitza com a control albúmina dissolta amb Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) tal com està dissolt l'àcid oleic i el linoleic.

En els experiments que les cèl·lules reben com a suplement els àcids grassos diluïts en etanol, les cèl·lules control reben una quantitat equimolar d'etanol. En aquests casos el suplement es dispensa directament de les alíquotes estoc al mateix moment de posar el medi de cultiu.

En tots els experiments la concentració dels diferents suplementes utilitzada és de 200µM.

### **III.III. Assaig d'incorporació de Timidina [<sup>3</sup>H]**

Es sembren 100.000 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous (Corning Inc., Corning, New York) i es deixen adherir durant una nit. Posteriorment, les cèl·lules es sotmeten durant 24 h a medi sense sèrum per tal de sincronitzar els cultius. Passat aquest temps les cèl·lules reben el medi complet juntament amb el corresponent suplement. Quatre hores abans de la recol·lecció de les cèl·lules, s'afegeix als pous 2µCi timidina [<sup>3</sup>H] (Amersham Biosciences). A les 4, 24 i 48 h posteriors a la primera suplementació es realitza l'assaig d'incorporació de timidina. Les cèl·lules

es renten un parell de vegades amb PBS fred. Per tal de precipitar els àcids nucleics, les cèl·lules es resuspenen amb una barreja de 5% àcid tricloracètic (TCA)/ 1% pirofosfat sòdic i es deixen precipitar durant una nit a 4 °C. Passat aquest temps les plaques es renten dues vegades amb PBS fred i s'incuben a 37 °C durant 2 h. Finalment les cèl·lules es resuspenen amb 700µl amb 0.3M NaOH fred durant 1 hora. De cada pou s'agafen 500µl i s'hi afegeixen 100µl de HCl 1.5M. S'utilitzen 180µl d'aquesta barreja pel comptatge. Les lectures es realitzen en el LS 7500 Liquid Scintillation System (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA). De cada condició es realitzen duplicats i l'experimental es repeteix tres cops.

### **III.IV. Estudis de diferenciació cel·lular**

El grau de diferenciació cel·lular es determina amb la tècnica de RT-PCR semiquantitativa de dos marcadors de diferenciació: Sucrasa-Isomaltasa (S-I) i Dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV). Es sembren 500.000 cèl·lules Caco-2 no confluents en plaques de 8.8 cm de diàmetre. És molt important que en el moment de la sembra les cèl·lules Caco-2 no estiguin confluents, ja que aquest tipus de cèl·lules tenen la peculiaritat de diferenciar-se per contacte. Posteriorment les cèl·lules s'alimenten diàriament amb el medi complet i el corresponent suplement. Als dies 2, 4, 7, 14 i 21 posterior a la primera suplementació les cèl·lules es llisen i s'extreu el RNA amb TriPure Isolation Reactive (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Per la retrotranscripció (RT) s'utilitzen 5 µg de RNA total, 0.5µg Oligo dT/µg RNA (pd T12-18 Pharmacia), 10mM de la barreja de deoxinucleòtids trifosfat (dNTP), 0.1M DTT, 1 x tampó de l'enzim i 10U AMV Reverse Transcriptase (Promega Corp, Madison, WI) en un volum final de reacció de 20 µl. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es fa en un volum final de 20 µL. Els paràmetres per aquestes amplificacions són: 750 ng de cDNA, 50 pmol de cada encebador (veure taula 1), 0.2 mmol/L de dNTP, 2 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L de KCl i 1U/µL de

RedTaq DNA polimerasa (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Els cicles de la PCR són els següents: (a) desnaturalització, 20 segons a 94 ° C; (b) annealing, 20 segons a la temperatura òptima per cada amplificació; (c) extensió, 30 segons a 72 ° C. Totes les PCR s'inicien amb una desnaturalització de 2 minuts a 94 ° C i s'acaben amb una elongació de 10 minuts a 72 ° C. Per cada combinació d'encebadors s'estudia la cinètica de l'amplificació. Es determina el cicle que correspon al plató i es realitzen les amplifícacions en el rang exponencial.

**Taula 1:** Condicions experimentals utilitzades en l'estudi de diferenciació

Gen	Encebadors (5'→3')	Tamany Amplificació (pb)	T <sup>a</sup> annealing (°C)	N <sup>o</sup> cicles
Queratina 8 (K-8)	F: TTGCCTCCTTCATAGACAAGG R: TGTTGTCCATGTTGCTTCG	110	60	28
Sucrasa Isomaltasa (S-I)	F: CGTGGCTGTGTATGGAGAACGG R: ACGGTAAGTTAGAGCAGGAGTTGGC	686	70	30
Dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV)	F: GCTGGTCATATGGAGGGTAC R: GCTGTGCTGCTAGCTATTCC	356	65	24

Els productes de PCR es separen en un gel d'agarosa del 2% i es tenyeixen amb bromur d'etidi. Les bandes corresponents a cada producte són quantificades en el *Molecular Imager FX* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Per tal d'avaluar el grau d'expressió dels dos marcadors de

diferenciació, els productes d'amplificació es normalitzen en funció de l'expressió del gen constitutiu Queratina 8. Posteriorment el grau d'inducció de l'enzim es valora entre els diferents suplementes i el control.

### **III.V. Determinació del grau d'apoptosi: Tinció amb DAPI**

Pels estudis d'apoptosi es sembren  $1.5 \times 10^5$  cèl·lules/mL en Slide Flask<sup>®</sup> (Nalgene Nunc International, Naperville, Il). Aquests flascons es caracteritzen perquè la seva superfície d'adhesió es converteix en un portaobjectes on hi creix el cultiu cel·lular. Un cop transcorregut el temps d'adhesió, les cèl·lules s'alimenten diàriament amb medi sense sèrum i el corresponent suplement. A les 24, 48 i 72 h després de la primera suplementació, les cèl·lules es renten dos cops amb Hank's Balanced Salts (HBSS) (Life Technologies Inc, Paisley, UK), es fixen durant 10 minuts amb 4 % paraformaldehid fred (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Posteriorment es renten dues vegades amb 1x PBS i es tenyeixen durant 1 minut amb DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)(Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands) a una dilució 1:500 en 1x PBS. El DAPI és un tint fluorescent de color blau que s'associa al solc menor de la doble cadena de DNA. El temps de contacte de les cèl·lules amb el tint és molt important perquè una durada massa llarga provoca una saturació en la tinció i no permet distingir de forma clara les cèl·lules apoptòtiques de les normals. Un cop tenyides les cèl·lules, es desmunta el flascó de cultiu quedant un portaobjectes amb la preparació fixada. En aquest moment els portaobjectes es renten abundantment sota l'aixeta amb aigua corrent. Per prevenir una ràpida pèrdua de fluorescència els portaobjectes es munten amb la solució antiesvaïment Vectashield<sup>®</sup> mounting medium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Les preparacions s'observen en un microscopi de fluorescència. Es conten mil nuclis per condició. L'experiment es repeteix vuit vegades.

L'apoptosi es detecta seguint els criteris morfològics àmpliament descrits: cèl·lules encongides, presència de protuberàncies a la membrana,

formació de cossos apoptòtics i condensació de la cromatina. Un únic cos apoptòtic gran, dens i rodó, així com un grup de petits cossos apoptòtics es consideren com una única cèl·lula apoptòtica.

L'índex d'apoptosi (IA) correspon al:

$$\text{nombre de cèl·lules apoptòtiques} / \text{nombre de cèl·lules totals} \times 100$$

### **III.VI. Estudis d'expressió proteica**

En els experiments d'expressió proteica, un cop sembrades les cèl·lules i transcorregut el temps d'adhesió, les cèl·lules s'alimenten amb medi sense sèrum i el corresponent suplement.

A les diferents hores postsuplementació, es llisen les cèl·lules amb tampó 1x GSB (2% SDS, 125 mmol/L Tris-HCl, 20% Glicerol, i 0.1% blau de bromofenol) i s'homogeneïtzen. Es determina la concentració obtinguda de cada extracció amb la corba estàndard de BSA; BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Es carreguen 30 o 75µg de proteïna per pou en un gel del 10-12 % SDS-poliacrilamida, els gels es sotmeten a un voltatge constant de 200 Volts durant 1 hora i posteriorment les proteïnes són transferides a una membrana de nitrocel·lulosa Porablot NCL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) o a una PVDF (Immobilion-P, Millipore,). Les membranes es bloquegen durant 1 hora amb el tampó de bloqueig (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, i 0.1% Tween 20) amb llet descremada en pols al 5%. Posteriorment les membranes s'incuben amb els anticossos desitjats (veure taula 2). Les dilucions de l'anticòs primari COX-2 es realitzen amb un 5% de llet descremada. Un cop realitzada la primera incubació, les membranes s'incuben amb un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave. Com a pas final s'utilitza el substrat de quimioluminiscència Signal West Pico (Pierce, Rockford, IL). Les membranes es revelen en films autoradiogràfics.

Cada membrana s'incuba amb l'anticòs antiactina. L'actina és un gen constitutiu ("housekeeping") que no canvia la seva expressió en funció de

les diferents condicions. Aquest fet ens permet utilitzar la seva expressió proteica com a control endogen i normalitzar les concentracions de les diferents mostres.

**Taula 2:** Condicions experimentals utilitzades en els estudis d'expressió proteica

<b>Proteïna - Anticòs</b>	<b>Dilució</b>	<b>Tipus d'incubació</b>
COX-2 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)	1:1000	1h a T <sup>a</sup> ambient
Bcl-2 (Santa Cruz Biotech. Santa Cruz, CA)	1:1000	Tota la nit 4°C
Actina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)	1:2000	1h a T <sup>a</sup> ambient

### **III.VII. Estudis d'expressió gènica**

Es sembren  $3 \times 10^6$  cèl·lules per placa de 8.8 cm de diàmetre. Transcorregut el període d'adhesió, les cèl·lules s'alimenten amb medi sense sèrum i el corresponent suplement a una concentració de 200  $\mu$ M. A les diferents hores postsuplementació (1,2,3,4, 8, 18 i 24) s'extreu el RNA amb Tripure. A partir d'1  $\mu$ g de RNA total es realitza la retrotranscripció reversa utilitzant High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Per cada estudi d'expressió en temps real s'utilitzen 50 ng cDNA.

Els estudis d'expressió gènica es realitzen en els arrays de baixa densitat Micro Fluidic Card 7900HT (Applied Biosystems). Aquest tipus d'array permet analitzar el grau d'expressió de dotze gens per quadruplicat i per mostra. L'hem dissenyat de manera que ens permeti estudiar el gen COX-2 i gens de la família de Bcl-2 (Bax, Bcl<sub>xl</sub>, Bcl-2). En totes les cards hi ha inclòs com a control endogen d'expressió el 18S Ribosomal. Un cop normalitzades les expressions amb el control endogen, es determina quantes vegades augmenta o disminueix l'expressió d'un gen concret en les cèl·lules suplementades amb el DHA o l'EPA en relació a l'etanol



(escollit com a valor de referència). Es considera estadísticament significatiu oscil·lacions superiors o iguals a 2 punts per sobre o per sota del valor de referència.

L'expressió del gen Bcl-2, també l'hem analitzat per PCR a temps real (RT\_PCR) en un Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)(taula 3). En cada anàlisi, s'amplifica per triplicat totes les condicions (diferents hores i diferents suplementes per cada gen).

**Taula 3:** Condicions experimentals utilitzades per estudiar l'expressió de Bcl-2

Gen	Encebadors (5'→3')	Tamany Amplificació (pb)	T <sup>a</sup> annealing (°C)	N <sup>o</sup> cicles
Bcl-2	F: CAGATGCACCTGACGCCCTT R: CCCAGCCGTCGTTATCCTGGA	253	55	40
Actina	F: CGGACTCGTCATACTCCTGCT R: CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	320	55	40

### **III.VIII. Determinació de l'apoptosi per citometria de flux**

Es sembren 475.000 cèl·lules per pou, en plaques de 6 pous, en un volum de 2 ml. Les cèl·lules es suplementen una única vegada amb medi sense sèrum i el suplementes a estudiar. A les hores determinades es recull el sobrenadant i es fan 2 rentats de les cèl·lules adherides amb 1x PBS fred. Posteriorment s'afegeix la tripsina a les cèl·lules i s'incuben durant 2 minuts a 37 ° C. Un cop obtingudes les cèl·lules adherides, s'ajunten amb

les del sobrenedant i es centrifuguen 5 minuts a 1600 rpm. Després d'uns rentats, el pellet es resuspèn amb el tampó d'unió (10 mM HEPES-NaOH pH 7,4, 5mM CaCl<sub>2</sub> i 140mM NaCl) amb 1 µl d'Annexina (Annexin-V-Fluos, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) i es deixa incubant durant 20 minuts a la foscor. Passat aquest temps, s'afegeix el tampó d'unió amb 0.5µg/µl de iodur de propidi (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a les mostres i ràpidament es llegeixen al citòmetre (FACScan).

Amb aquestes tincions podem diferenciar les cèl·lules apoptòtiques primerenques (tinció d'annexina), les cèl·lules apoptòtiques tardanes i les necròtiques (tinció doble, annexina i iodur de propidi) i les cèl·lules vives (sense tinció).

## **ESTUDIS *IN VIVO***

### **III.IX. Inducció de carcinogènesi colorectal *in vivo***

Rates Sprague-Dawley mascles de quatre setmanes de vida (B&K Universal, Barcelona, Espanya) s'estabulen en parelles en unes gàbies que disposen d'una reixa basal per tal d'evitar la coprofàgia i la ingesta d'encenalls. Les rates es sotmeten a cicles de llum i foscor de 16 h/ 8h, a una humitat del 50% i a una temperatura de 21 ° C. Els animals mengen i beuen *ad libitum*. Cada dia s'omple de nou el recipient amb el menjar.

Per aquests estudis *in vivo* s'utilitzen quatre tipus de dieta que difereixen en el tipus d'àcid gras que la formen. En tots els casos l'aport lipídic és del 5 %. El grup n-6 rep una dieta amb predomini de l'àcid linoleic (oli de còrtam), en el grup n-9 el predomini és de l'àcid oleic (oli d'oliva extra verge), el grup n-3 rep majoritàriament els àcids eicosapentaenoic i docosahexaenoic (oli de peix) i el grup n-3/n-9 rep aquests dos tipus d'àcid gras però en cap cas superant el 5%.

Cada grup dietètic està format per 5 rates que reben el carcinogen i per una rata que rep una solució salina com a control. Des de l'inici de

l'estabulació les rates ja s'alimenten amb les diferents dietes. A la quarta setmana de vida, les rates reben una única dosi del carcinogen azoximetà (Sigma Aldrich, St Louis, MO) a una proporció de 10 mg/kg de pes mitjançant una injecció subcutània. Les rates control reben una injecció de salí amb el mateix volum que les tractades.

Sis hores després de la inducció, les rates s'anestesien amb una barreja d'atropina, ketolar i diazepam. En el moment d'obtenir el còlon la rata es sacrifica. En condicions fredes el còlon s'obre longitudinalment i es renta diverses vegades amb PBS fred. De cada còlon es separen dues peces de la porció distal i dues de la proximal. Les peces es fixen en 4% paraformaldehid fred durant una nit. Després d'un bon rentat (dues hores sota l'aixeta), es fixen en etanol al 70 %. Posteriorment cada peça s'inclou en un bloc de parafina. De cada bloc s'obtenen talls de 3 µm de gruix.

### **III. X. Determinació del grau d'apoptosi: TUNEL**

TUNEL és una tècnica d'identificació d'apoptosi basada en el marcatge específic de la fragmentació del DNA. Permet detectar aquelles cèl·lules que presenten fragments terminals de DNA, com a resultat d'un procés apoptòtic, localitzats típicament en el nucli i en els cossos apoptòtics.

Per realitzar aquests estudis, es rehidraten els talls procedents dels còlons de les rates amb una bateria d'etanols. Posteriorment es digereix el teixit amb una solució de Pepsina (2,5mg pepsina en 50ml HCl 0'1N) durant 4 minuts. Després d'uns rentats, per bloquejar les peroxidases endògenes, els teixit es sotmeten a una solució de 45 ml de metanol amb 0,46 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% durant 30 minuts. Seguidament s'incuben les mostres amb 0.2 % Tritó X-100/Citrat de sodi durant dos minuts en gel. Després d'uns rentats s'aplica el tampó d'equilibri, es renta amb 0.1% BSA/PBS, s'aplica l'enzim TdT (ApopTaq, Serologicals Corporation) i s'incuba en una cambra humida a 37 ° C durant 1h 30'. Transcorregut aquest temps s'atura la reacció i s'aplica el conjugat antidigoxigenina peroxidasa (11µl/cm<sup>2</sup>) durant 1h a la cambra humida. Després d'uns rentats, les preparacions es

contratenyeixen amb hematoxilina i es deshidraten. Les preparacions s'observen al microscopi òptic. Una cèl·lula es considera apoptòtica quan es detecta una tinció marró intensa i brillant.

## **ANÀLISI ESTADÍSTIC**

Amb el tipus d'estudis realitzats es necessari aplicar un test no paramètrics. En l'anàlisi estadístic s'utilitza l'anàlisi per rang de la variança de Kruskall Wallis one way i el test de U de Mann-Whitney per determinar les diferències significatives entre diferents condicions. S'assumeix com a diferències estadísticament significatives una  $P < 0.05$ .

## **IV. RESULTATS**

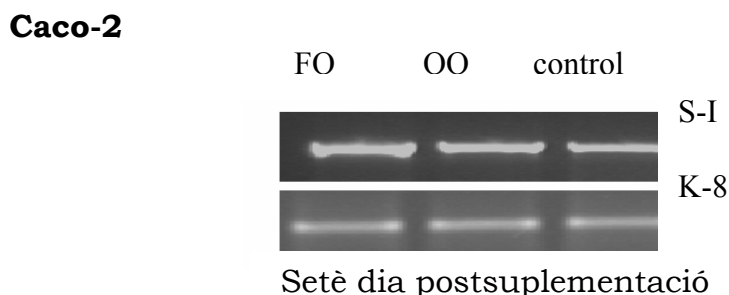
## **ESTUDIS IN VITRO**

### **IV.I. L'oli de peix, l'oli d'oliva indueixen la diferenciació de les cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal Caco-2**

Per avaluar si l'oli de peix i el d'oliva són capaços d'induir la diferenciació cel·lular es mesura el grau d'expressió a nivell de RNA missatger dels enzims Sucrasa-Isomaltasa (S-I) i de la Dipetidilpeptidasa IV (DPP IV). Aquests dos enzims estan sobreexpressats en les cèl·lules Caco-2 diferenciades.

El grau d'expressió es determina mitjançant RT-PCR semiquantitatives amb els encebadors de la S-I, DPP IV i de la queratina 8 (K8), un enzim constitutiu que no varia la seva expressió en funció del grau de diferenciació cel·lular. El nombre de cicles concret per cada fragment amplificat correspon a la fase exponencial, determinada després de realitzar una cinètica per cada parella d'encebadors.

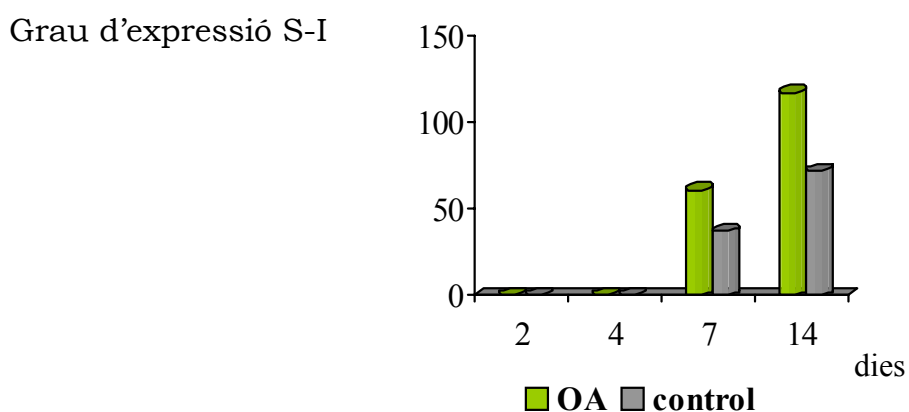
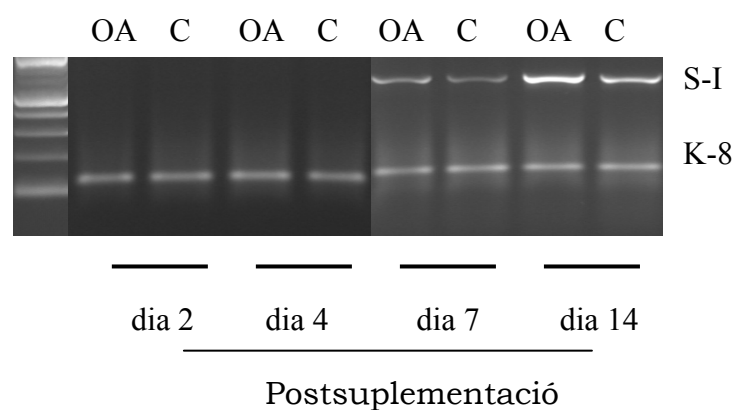
Les cèl·lules Caco-2 suplementades amb oli de peix i oli d'oliva presenten un increment en l'expressió tant de l'enzim Sucrasa-Isomaltasa (figura 1) com del Dipeptidilpeptidasa IV al setè i catorzè dia postsembra.



**Figura 1:** Expressió de l'enzim Sucrasa-Isomaltasa al setè dia postsuplementació

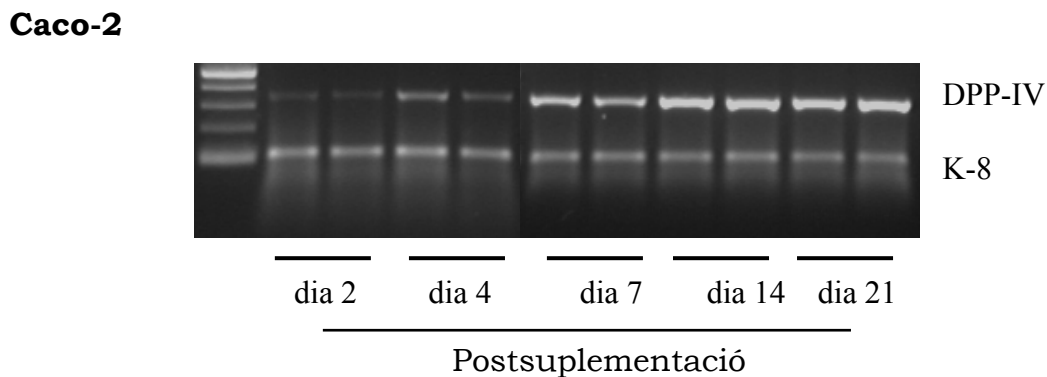
L'àcid oleic component principal de l'oli d'oliva (aproximadament un 70% de l'oli d'oliva és àcid oleic) indueix la diferenciació cel·lular de les cèl·lules Caco-2. Un cop normalitzades les expressions en funció del gen constitutiu queratina 8, al setè i catorzè dia després de la primera suplementació ja podem observar que el grau d'expressió de l'enzim S-I és significativament superior en les cèl·lules suplementades amb l'àcid oleic (figura 2).

### Caco-2



**Figura 2:** La gràfica representa el grau d'expressió de l'enzim S-I determinat per densitometria dels resultats obtinguts en els gels.

Quan analitzem l'expressió de l'enzim DPP-IV en les cèl·lules Caco-2 suplementades amb àcid oleic observem un increment al quart dia posterior al tractament (figura 3).



**Figura 3:** Expressió de l'enzim DPP-IV en cèl·lules Caco-2

Al vint-i-unè dia és impossible veure cap tipus de diferència entre els suplementes perquè els nivells d'expressió del RNA missatger d'aquests enzims estan a plató degut a que les cèl·lules ja estan diferenciades per efecte del contacte.

#### **IV.II. L'oli de peix té un important efecte en la inhibició de la proliferació cel·lular**

Per determinar l'efecte dels diferents nutrients en la proliferació cel·lular, s'analitza el grau d'incorporació de timidina  $H^3T$  com a marcador de proliferació; la timidina s'incorpora en aquelles cèl·lules que estan sintetitzant DNA.

L'efecte dels diferents suplementes és molt més important en les cèl·lules HT-29 que en les Caco-2 (figura 4 i figura 5 respectivament).

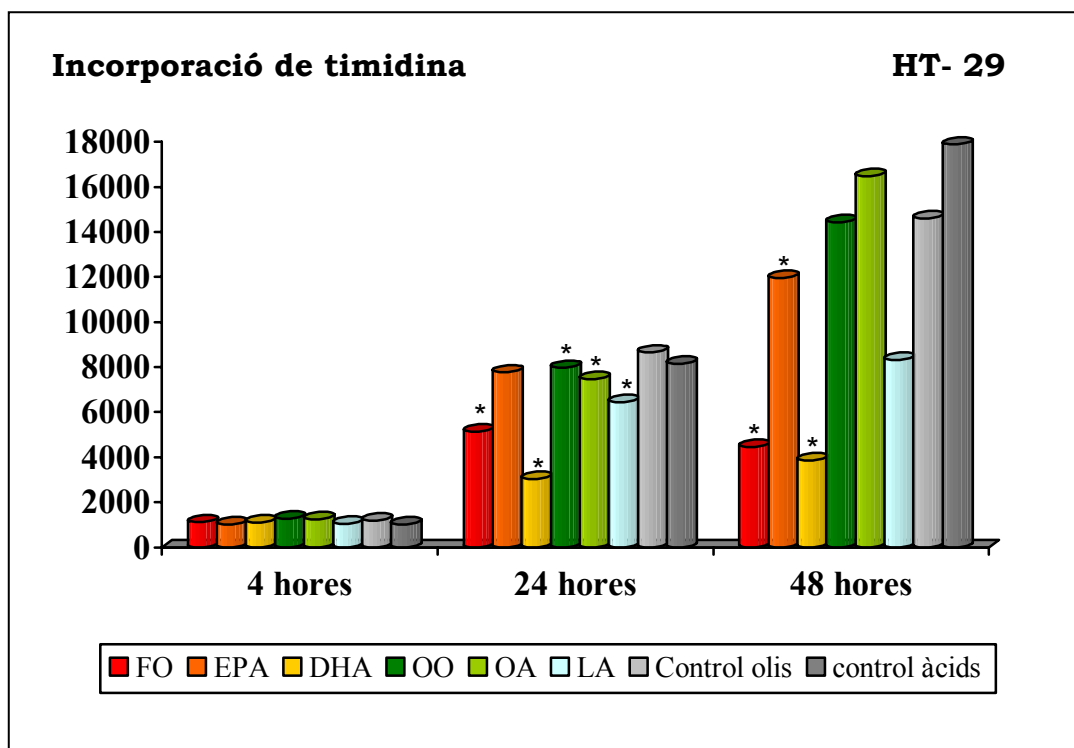
La suplementació de les cèl·lules HT-29 i Caco-2 amb oli de peix provoca una dràstica inhibició en la proliferació cel·lular a les 24 i 48



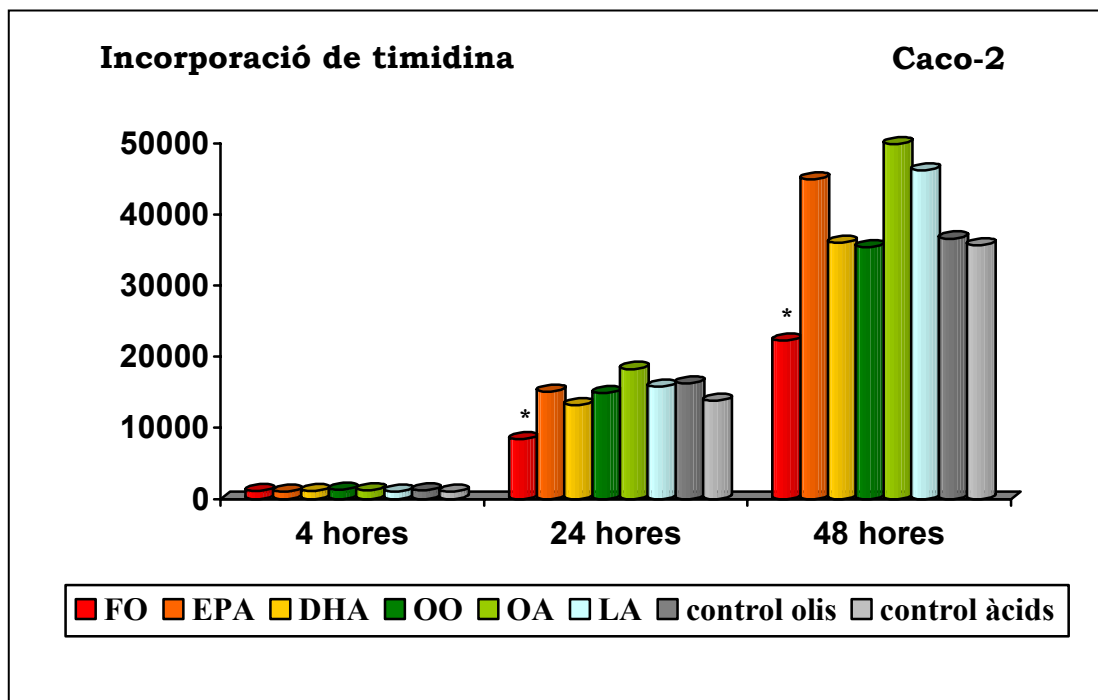
hores, fet que es tradueix en una menor incorporació de timidina H<sup>3</sup>T. Si considerem l'índex de proliferació del controls com el 100 %, en el cas de cèl·lules Caco-2 suplementades amb oli de peix aquest és d'un 52% a les 24 hores i d'un 61% a les 48. En les cèl·lules HT-29 el percentatge d'incorporació de timidina és del 59% a les 24 hores i del 30% a les 48 hores.

A les 48 hores després de la primera suplementació amb els àcids n-3 DHA i EPA, constituents de l'oli de peix, les cèl·lules HT-29 presenten un destacada inhibició en la seva proliferació cel·lular (figura 4).

La suplementació amb oli d'oliva resulta en una modesta inhibició de la proliferació en les cèl·lules HT-29 a les 24 hores. En aquestes cèl·lules l'àcid oleic i l'àcid linoleic inhibeix lleugerament la proliferació cel·lular.



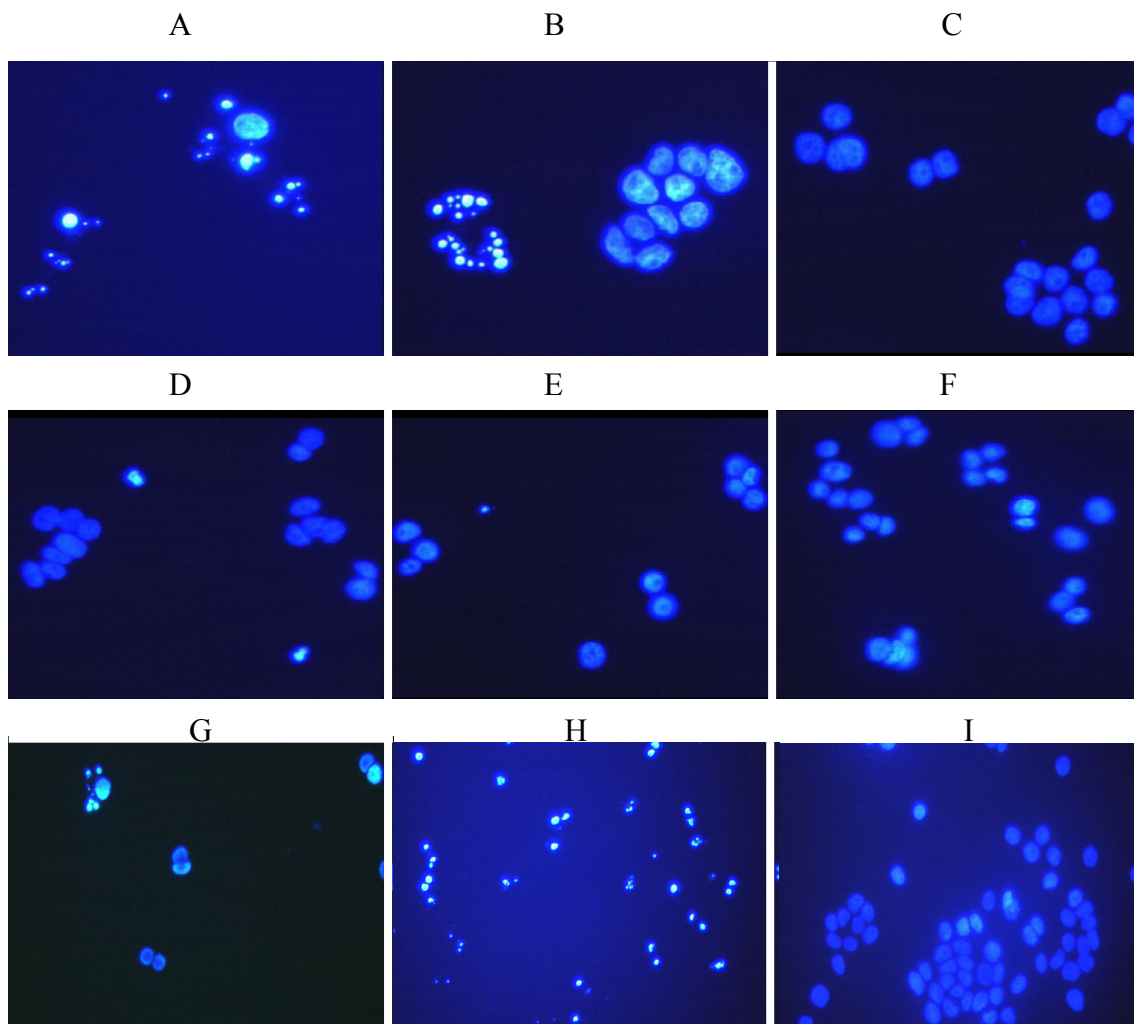
**Figura 4.** Incorporació de timidina. Per cada condició es fan duplicats i l'experiment es repeteix tres vegades. \*  $P < 0.05$  vs control.



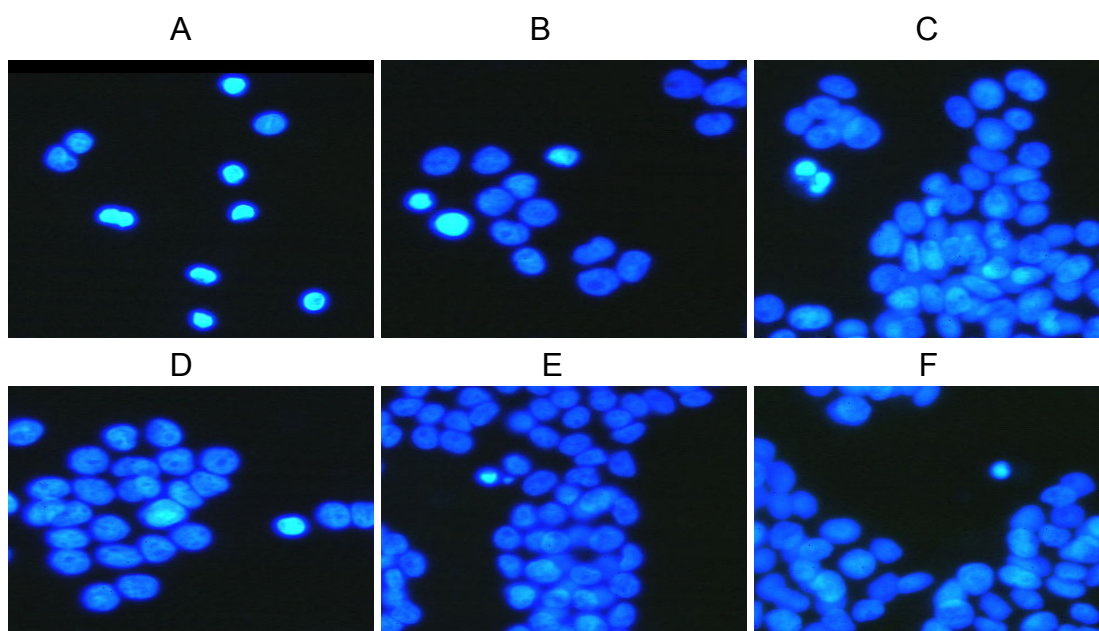
**Figura 5.** Incorporació de timidina. Per cada condició es fan duplicats i l'experiment es repeteix tres vegades. \*  $P < 0.05$  vs control.

#### **IV.III. Inducció de l'apoptosi per efecte dels diferents nutrients**

El grau d'apoptosi es determina, en primer lloc, en relació als canvis morfològics de les cèl·lules adherides (cèl·lules encongides, presència de protuberàncies a la membrana, formació de cossos apoptòtics i condensació de la cromatina) (figura 6, A i B). En totes les condicions on s'han produït inducció de l'apoptosi s'observa un gran nombre de cèl·lules surant en el medi fet que coincideix amb un nombre de cèl·lules totals molt inferior al de les cèl·lules tractades amb suplement control (figura 7 A i 7 C respectivament).



**Figura 6.** Imatges de microscopia de fluorescència de cèl·lules HT-29 tenyides amb DAPI al les 48 hores post suplementació amb A) oli de peix, B) oli d'oliva, C) control olis, D) àcid linoleic, E) àcid oleic, F) control àcids; i a les 24 hores postsuplementació amb G) àcid docosahexaenoic, H) àcid eicosapentaenoic, I) control.

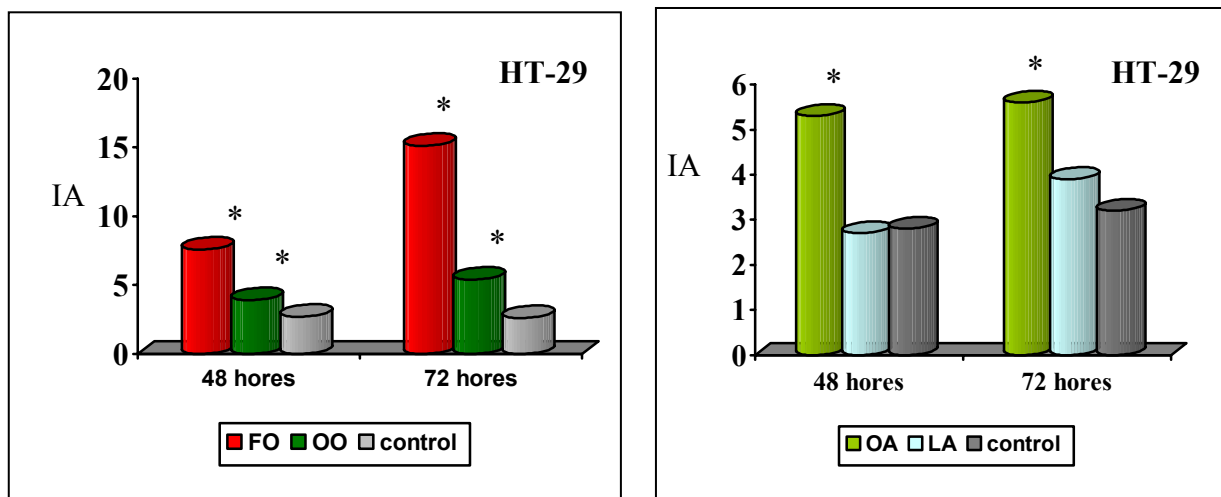


**Figura 7.** Imatges de microscopia de fluorescència de cèl·lules Caco-2 tenyides amb DAPI suplementades amb A) oli de peix, B) oli d'oliva, C) control olis, D) àcid linoleic, E) àcid oleic, F) control àcids a 48 hores.

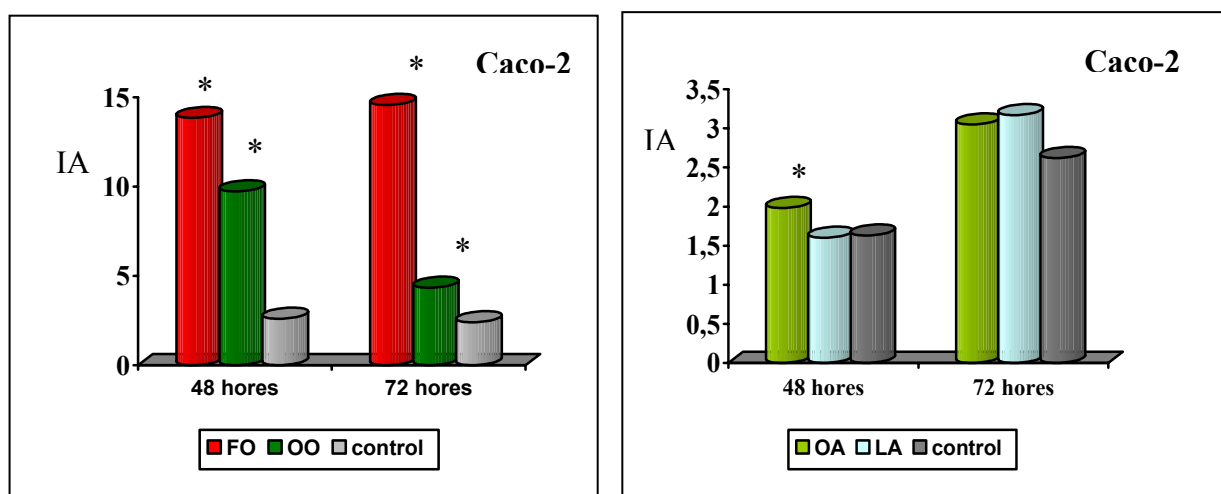
L'oli de peix i l'oli d'oliva indueixen significativament l'apoptosi de les cèl·lules HT-29 i Caco-2 a les 48 i 72 hores després de la primera suplementació (figura 8 i 9).

Tant l'àcid eicosapentaenoic com l'àcid docosahexaenoic provoquen una dràstica inducció de l'apoptosi, a les 24 hores postsuplementació. En aquest moment, aproximadament el 90% de les cèl·lules són apoptòtiques (figura 6).

Per altre banda, l'àcid oleic indueix de forma significativa la mort cel·lular de les cèl·lules HT-29 i Caco-2 tot i que en aquest darrer cas, l'estimulació produïda és molt més discreta (figura 9).



**Figura 8:** Índex d'apoptosi (IA) a diferents temps puntuals d'anàlisi. IA correspon al nombre de cèl·lules apoptòtiques/nombre total de cèl·lules x 100 \*  $P < 0.05$  respecte el control.



**Figura 9:** Índex d'apoptosi (IA) a diferents temps puntuals d'anàlisi. IA correspon al nombre de cèl·lules apoptòtiques/nombre total de cèl·lules x 100 \*  $P < 0.05$  respecte el control.

Per altra banda, tant en les Caco-2 com en les HT-29 l'oli de peix té un efecte inductor molt superior al de l'oli d'oliva. Aquesta major apoptosi

per part de l'oli de peix s'observa també en el cas del tractament amb els seus àcids grassos principals (DHA i EPA).

Cal remarcar que el percentatge observat d'inducció de l'apoptosi correspon a les cèl·lules adherides que mostren característiques típiques de cèl·lules en procés d'apoptosi en un moment puntual d'anàlisi. El grau d'apoptosi real possiblement és major que l'observat, però degut el curt període que hi ha entre l'inici del procés apoptòtic amb el desenganxament de les cèl·lules de la superfície d'adhesió i la total desintegració d'aquestes, la detecció de l'apoptosi es limita únicament a una part del total de les cèl·lules apoptòtiques. Així, a part de les cèl·lules en procés d'apoptosi detectades en el mateix moment de l'estudi, també s'observa un important descens en el nombre total de cèl·lules adherides a la superfície del cultiu.

#### **IV.III.I. Implicació dels diferents components de la família Bcl-2 en l'apoptosi**

Hem avaluat la implicació de diferents elements de la família Bcl-2 en l'apoptosi observada mitjançant l'estudi dels canvis d'expressió a nivell de RNA missatger a temps real (amb la utilització d'arrays de baixa densitat especialment dissenyats per aquest experiments) i a nivell d'expressió proteica a diferents hores postsuplementació.

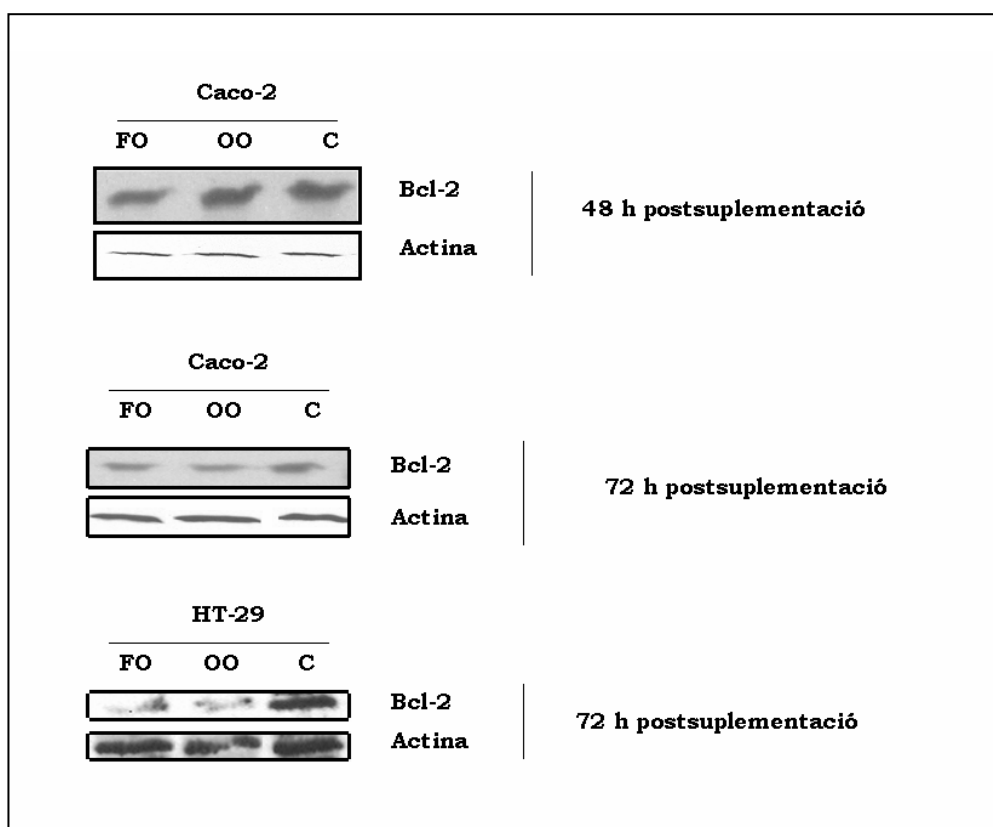
##### **IV.III.I.a. Implicació de Bcl-2**

Com s'ha comentat en la secció dels mètodes, l'expressió gènica de Bcl-2 ha estat finalment avaluada per RT\_PCR (PCR a temps real) i no mitjançant els arrays d'expressió.

Amb els nous encebadors utilitzats per la RT\_PCR s'ha confirmat una bona amplificació del gen Bcl-2 en mostres control. Referent als efectes deguts a la suplementació amb els diferents nutrients (DHA i EPA), no

s'ha trobat canvis significatius en l'expressió gènica de Bcl-2 en cap condició.

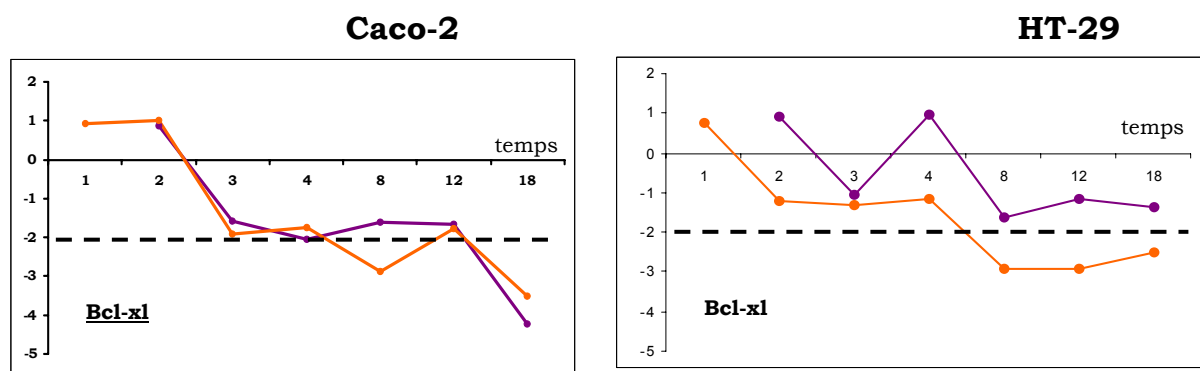
A l'estudiar, a nivell d'expressió proteica, els efectes deguts a la suplementació amb l'oli d'oliva i l'oli de peix, s'ha observat que les cèl·lules que han rebut aquests suplementos mostren una disminució de l'expressió de Bcl-2 respecte les cèl·lules tractades amb control. Aquests efectes s'ha mostrat en les dues línies cel·lulars estudiades (Caco-2 i HT-29). La inhibició proteica de Bcl-2 és produïda a les 48 i 72 h després de la primera suplementació (figura 10). A les 72 hores és el moment que s'observa la màxima disminució de l'expressió de Bcl-2 i aquesta coincideix amb el major percentatge de cèl·lules apoptòtiques detectades amb DAPI.



**Figura 10:** Expressió proteica de Bcl-2 en cèl·lules tractades amb oli d'oliva (OO) i oli de peix (FO)

#### **IV.III.I.b. Implicació de Bcl-x<sub>L</sub>**

A nivell gènic, hi ha una disminució de l'expressió de Bcl-x<sub>L</sub> significativa a partir de les 12 hores en el cas de les cèl·lules Caco-2 suplementades amb DHA i EPA, i a partir de les 6 hores en les HT-29. En aquest darrer cas, la inhibició únicament la provoca la suplementació amb EPA (figura 11). En general, la implicació de Bcl-x<sub>L</sub> en la inducció de l'apoptosi per part del DHA i de l'EPA en línies cel·lulars de càncer de còlon sembla molt modesta.



**Figura 11:** Variació de l'expressió gènica de Bcl-x<sub>L</sub> respecte el control en funció del temps. La línia lila correspon al suplement amb DHA, i la taronja amb EPA. La línia discontinua correspon al llindar de significança de l'assaig (a partir de on s'observen diferències significatives respecte el control).

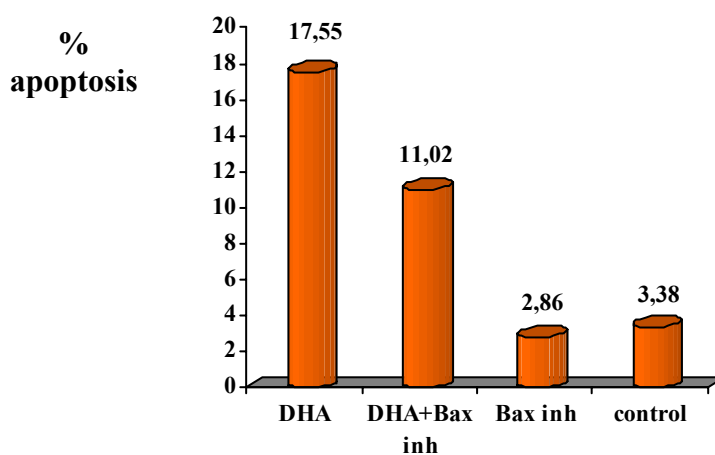
#### **IV.III.I.c. Implicació de Bax**

Bax és un element clau en el desencadenament de l'apoptosi i està implicat en l'alliberament del citocrom-c de la mitocòndria al citosol.

Per a determinar si Bax té un paper destacat en la inducció de l'apoptosi per efecte del DHA, hem decidit estudiar quina implicació

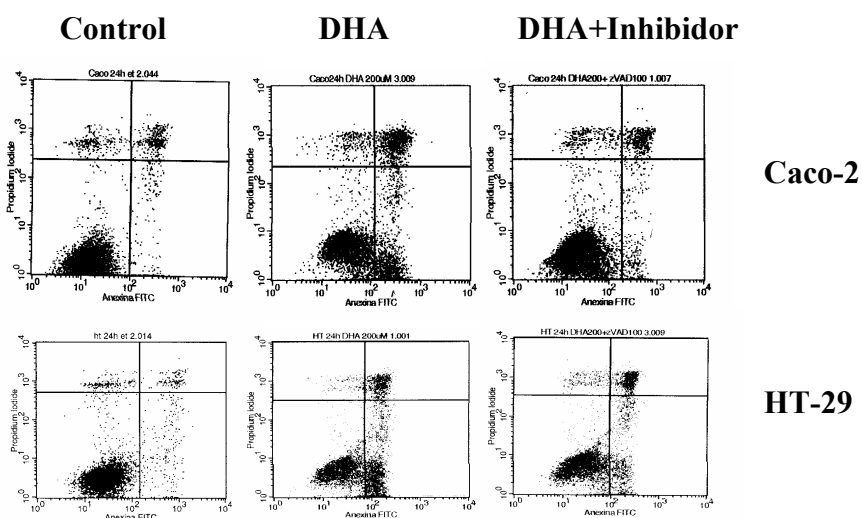


tindria la inhibició de Bax. Per aquest motiu, en el mateix moment que es suplementen les cèl·lules amb l'àcid gras s'afegeix al medi de cultiu un inhibidor específic de Bax. Hem pogut observar que les cèl·lules tractades amb DHA i l'inhibidor presenten un grau d'apoptosi significativament inferior al de les cèl·lules tractades exclusivament amb el DHA (figura 12). En la figura 13, es pot observar que la població apoptòtica (quadrant dret inferior) és molt important en el segon gràfic, i que aquesta població disminueix al afegir el inhibidor. Aquesta disminució en l'apoptosi indicaria que la proteïna proapoptòtica Bax està implicada en l'apoptosi induïda per DHA.



**Figura 12:** Representació del % d'apoptosi induïda pel DHA, en comparació amb l'apoptosi induïda en presència d'un inhibidor de Bax.

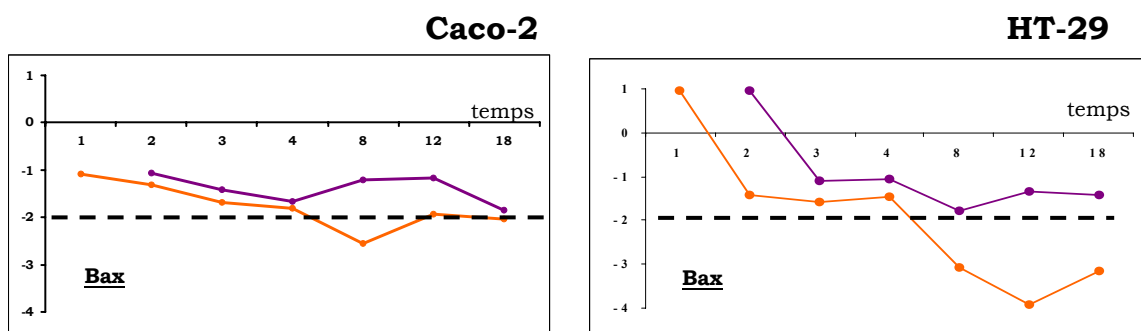
\*  $P < 0.05$  respecte DHA



**Figura 13:** Aquests gràfics de citometria de flux representen la

concentració de iodur de propidi *versus* la d'annexina-V. Cada diagrama està dividit en quatre quadrants. El quadrant inferior esquerra correspon a les cèl·lules vives (cèl·lules no tenyides). El quadrant inferior dret correspon a les cèl·lules apoptòtiques (tenyides únicament amb annexina-V) i el quadrant superior esquerra correspon a les cèl·lules necròtiques i apoptòtiques tardanes (cèl·lules amb doble tinció, annexina-V i iodur de propidi) tenyides únicament amb annexina-V). El darrer quadrant correspon a les cèl·lules danyades.

A nivell d'expressió gènica hem observat que la implicació de Bax és mínima ja que la seva expressió pràcticament no varia o disminueix lleugerament (figura 14).

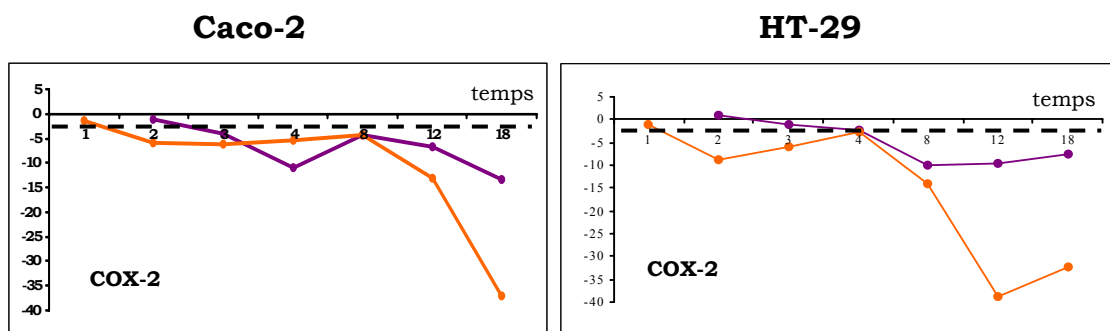


**Figura 14:** Variació de l'expressió gènica de Bax respecte el control en funció del temps. La línia lila correspon al suplement amb DHA, i la taronja amb EPA. La línia discontinua correspon al llindar de significança de l'assaig.

#### **IV.III.II. Implicació de COX-2 en l'apoptosi induïda pels àcid grassos n-3 i n-9**

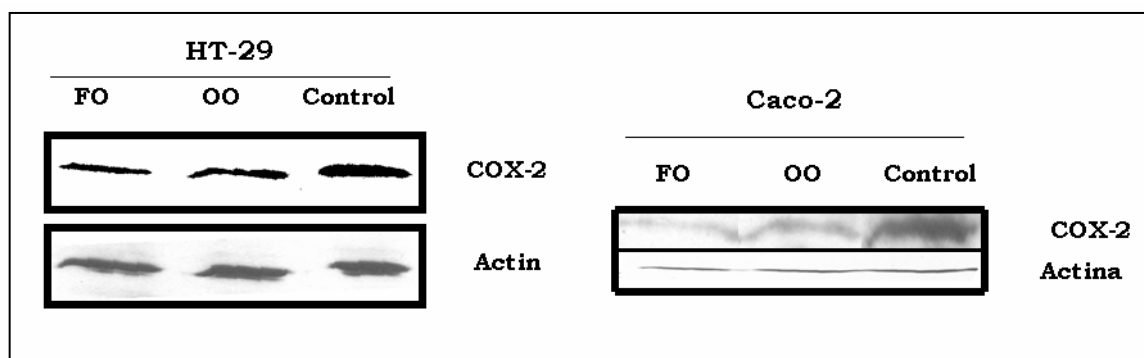
COX-2 és un gen que respon de forma ràpida i transitòria davant de diferents estímuls. Està implicat en la biosíntesi de les prostaglandines i sembla que tindria un paper important en la regulació de l'apoptosi al estimular, a través d'aquestes, Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>.

L'expressió gènica de COX-2 en les cèl·lules suplementades amb DHA i EPA es troba altament reprimida. A les dues hores posteriors a la suplementació ja s'observa aquesta significativa disminució dels nivells de COX-2 (figura 15).



**Figura 15:** Variació de l'expressió gènica de COX-2 respecte el control en funció del temps. La línia lila correspon al suplement amb DHA, i la taronja amb EPA. La línia discontinua correspon al llindar de significança de l'assaig.

A nivell d'expressió proteica, les cèl·lules Caco-2 i HT-29 suplementades amb oli de peix i oli d'oliva presenten una clara inhibició de l'expressió de COX-2 a les 4 hores postsuplementació. A diferència, l'expressió del gen Actina és constant en totes les hores i condicions (figura 16).



**Figura 16:** Expressió de COX-2 a les 4 hores posteriors al tractament amb oli de peix i oli d'oliva.

## **ESTUDIS *IN VIVO***

### **IV.III.III. Efecte protector de l'oli de peix i de l'oliva en la inducció de la carcinogènesi colorectal**

Per a poder avaluar l'efecte de l'oli de peix i de l'oli d'oliva *in vivo*, s'han utilitzat quatre grups de rates que difereixen entre ells en el tipus d'àcid gras que compon la seva dieta. El grup n-6 ha rebut una dieta amb predomini de l'àcid linoleic (oli de càrtam), en el grup n-9 el predomini és de l'àcid oleic (oli d'oliva extra verge), el grup n-3 ha rebut majoritàriament els àcids eicosapentaenoic/docosaheptaenoic (oli de peix), el grup n-3/n-9 ha rebut els dos tipus d'àcid gras. Cada grup està compost per 5 rates que han rebut el carcinogen i per una rata que ha rebut una solució salina com a control. S'ha determinat el grau d'inducció d'apoptosi utilitzant un marcatge específic de la fragmentació del DNA (TUNEL).

En primer lloc s'ha analitzat l'efecte de les diferents dietes en animals sans amb l'objectiu d'avaluar el possible ús d'aquests com a agents preventius del desenvolupament del càncer colorectal. Hem pogut demostrar que els animals que han rebut la dieta amb l'àcid gras n-3 presenten un índex d'apoptosi significativament superior a l'observat en les rates alimentades amb les dietes de n-6 o n-9 (taula 1). A l'analitzar l'índex d'apoptosi del grup que ha rebut els dos tipus d'olis junts (n-3 i n-9) observem que aquesta barreja no provoca un efecte sumatori o sinèrgic. Si ens fixem en els resultats, veurem que en el grup n-3/n-9, l'índex d'apoptosi és el mateix que el reportat en les rates alimentades amb la dieta n-3. Amb aquest estudi hem pogut demostrar que una dieta amb una quantitat normal d'oli de peix és capaç de modular l'apoptosi del teixit colònic sa de rates.

<b>- AOM</b>	<b>IA ± SEM</b>
<b>n-3</b>	<b>0,26 ± 0,02 *</b>
<b>n-9</b>	<b>0,05 ± 0,03</b>
<b>n-6</b>	<b>0,09 ± 0,04</b>
<b>n-3+n-9</b>	<b>0,27 ± 0,018 *</b>

**Taula 1 :** Inducció de l'apoptosi en rates tractades amb salí. Índex d'apoptosi (IA): N° cel. apoptòtiques/N° cel. total x 100. \*  $P < 0.05$  vs n-6

En segon lloc hem avaluat l'efecte de les diferents dietes en rates que se'ls hi ha administrat una única dosi del carcinogen. En aquest model agut d'inducció de la carcinogènesi, cal destacar que en el moment del sacrifici les rates no presenten cap tipus de lesió macroscòpica ni microscòpica. En aquest cas hem pogut observar que les rates alimentades amb oli d'oliva i amb oli de peix presenten un índex d'apoptosi significativament superior al de les rates que han rebut l'oli de càrtam (taula 2). Aquest olis tenen la capacitat d'incidir en el desenvolupament de càncer colorectal en un model *in vivo*. En les rates tractades amb azoximetà, tampoc s'observa un efecte sumatori de l'administració dels dos olis junts.

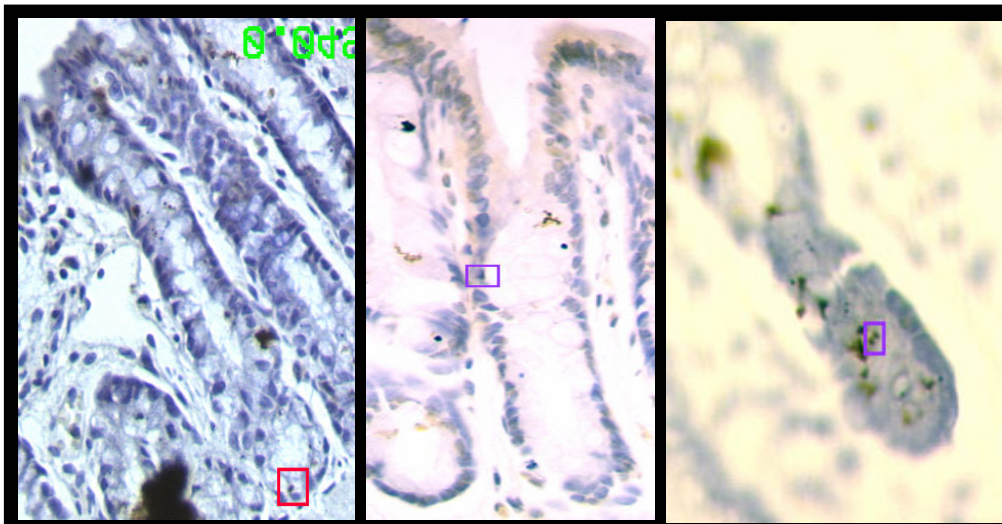
<b>+ AOM</b>	<b>IA ± SEM</b>
<b>n-3</b>	<b>0,85 ± 0,16 *</b>
<b>n-9</b>	<b>1,27 ± 0,17 *</b>
<b>n-6</b>	<b>0,29 ± 0,04</b>
<b>n-3+n-9</b>	<b>1,26 ± 0,26 *</b>

**Taula 2:** Inducció de l'apoptosi en rates tractades amb azoximetà. Índex

d'apoptosi (IA) és el nombre de cèl·lules apoptòtiques/nombre total de cèl·lules x 100. \*  $P < 0.05$  vs n-6

En tots els casos l'apoptosi observada en les rates tractades amb azoximetà és superior al de les rates sanes (taula 1 i 2). Aquesta diferència és deguda al efecte de l'administració el carcinogen.

Per altra banda cal remarcar la localització preferentment basal de les cèl·lules apoptòtiques (figura 17). La majoria de l'apoptosi s'observa el terç inferior de la cripta, prop de la zona on hi ha les cèl·lules que estan activament proliferant.



**Figura 17:** Imatges al microscopi òptic de cèl·lules apoptòtiques amb revelat de DAB i contra-tinció de hematoxilina. Una cèl·lula es considera apoptòtica quan es detecta una tinció marró intensa i brillant.

## **V. DISCUSSIÓ**

El càncer de còlon és un dels càncers més comuns, i constitueix la segona causa de mort per càncer en el món occidental, tant en dones com en homes.

Hi ha nombrosos estudis que suggereixen que el desenvolupament del càncer colorectal és el resultat d'una estreta interrelació entre factors genètics i mediambientals. En aquest procés, la dieta i l'estil de vida semblen tenir un paper important<sup>7-9</sup>. Diferents estudis epidemiològics suggereixen que els factors dietètics, en particular la ingesta calòrica i la d'àcids grassos saturats, podrien ser de gran importància en l'etiologia del càncer de còlon.

L'any 1997, un grup de científics de "American Institute for Cancer Research" i de "World Cancer Research Foundation" van debatre sobre la importància de la dieta en el desenvolupament del càncer colorectal i van arribar al consens que hi havia suficients evidències que demostraven que existia una estreta associació entre el consum de greixos saturats i/ o greixos animals amb un major risc de patir càncer de còlon<sup>44</sup>. Estudis en diferents poblacions revelen que les persones amb dietes amb un elevat contingut de grassa animal tenen major risc de desenvolupar càncer colorectal. Diferents estudis han suggerit un efecte potencialment protector de l'oli d'oliva<sup>62,63</sup>. Per altra banda també s'ha observat una clara associació entre el consum de dietes amb una alta proporció d'oli de peix o peix i un menor risc<sup>52</sup>.

Sembla doncs de gran importància estudiar els efectes deguts a l'administració de l'oli de peix i l'oli d'oliva en el desenvolupament del càncer colorectal doncs aquests dos tipus de greix són habituals en la nostra dieta. L'oli d'oliva és un aliment ingerit de forma pràcticament diària en la majoria de les famílies de la conca mediterrània, en les quals també hi ha un elevat consum de peix.

Amb l'objectiu d'avaluar els possibles efectes moduladors de la carcinogènesi colorectal per part de diferents olis, es va decidir utilitzar dues línies clarament diferents d'adenocarcinoma colorectal i així



descartar possibles efectes específics del tipus de cèl·lules. També s'utilitzà un model animal d'inducció de la carcinogènesi colorectal per tal de definir d'una forma més precisa els efectes d'aquest greixos en l'ésser viu.

La diferenciació cel·lular és un procés complex que permet, a la cèl·lula, desenvolupar unes funcions molt més especialitzades<sup>22</sup>. Quan una cèl·lula està diferenciada, aquesta deixa de proliferar activament. La inducció de la diferenciació és considerat com un marcador antitumoral. Alguns autors han descrit un increment del marcador de diferenciació *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) en rates tractades amb azoximetà alimentades amb una dieta on la font principal de greix és l'oli de peix<sup>46</sup>. Altres autors han demostrat un increment del DBA en la mucosa colònica normal de rates alimentades amb DHA o EPA.

La inducció de la diferenciació cel·lular és un dels mecanismes pels quals, diferents nutrients poden exercir un efecte antineoplàstic.

En aquest estudi, hem analitzat l'efecte de l'oli de peix i l'oli d'oliva en el procés de la diferenciació cel·lular de les cèl·lules Caco-2. Aquestes cèl·lules són un bon model per a determinar la capacitat d'induir la diferenciació, doncs les Caco-2 es poden diferenciar al ser sotmeses a diferents estímuls. Com a resultat de la suplementació amb els olis, hem comprovat que les cèl·lules diferenciades adquireixen unes noves característiques. Per efecte de l'administració dels olis, les cèl·lules Caco-2 expressen els enzims específics de cèl·lules diferenciades. L'efecte provocat per l'oli d'oliva sembla ser degut a l'àcid oleic ja que, al suplementar les cèl·lules amb aquest àcid, es produeix una inducció de la diferenciació cel·lular similar al de les cèl·lules suplementades amb l'oli d'oliva. Fins al moment, no hi havia cap treball publicat on s'avalués l'efecte d'aquests nutrients sobre la diferenciació.

El creixement tumoral es caracteritza per un desequilibri entre dos processos principals que controlen l'homeostasi cel·lular: la proliferació i l'apoptosi. La capacitat de frenar la proliferació o d'induir l'apoptosi per

part d'aquests nutrients podria ser fonamental per a controlar el desenvolupament tumoral.

En primer lloc, s'ha estudiat la capacitat d'aquest olis de frenar la proliferació cel·lular. Hem pogut constatar que l'oli de peix té un potent efecte inhibidor de la proliferació cel·lular en ambdues línies cel·lulars. D'altra banda, l'oli d'oliva únicament té capacitat de modular la proliferació de les cèl·lules HT-29.

Posteriorment hem analitzat si els efectes són deguts als àcids grassos presents en els olis o bé a altres components d'aquests. En el cas de les cèl·lules HT-29, on la inhibició de la proliferació és molt més destacada, sembla que aquesta disminució és resultat de l'efecte dels àcids grassos. Aquests resultats són clarament diferents als publicats per Salerno *et al*, en que van descriure que l'àcid oleic no inhibia la proliferació cel·lular de les cèl·lules HT-29<sup>66</sup>. Possiblement aquestes diferències són degudes al tipus d'experiment realitzat. En el treball de Salerno, les cèl·lules van rebre una única dosi de suplement mentre que en el nostre estudi les cèl·lules van ser alimentades diàriament. Per altra banda, els efectes antiproliferatius dels àcids DHA i EPA si que havien estat observats en rates tractades amb azoximetà<sup>58</sup>. Sembla que aquesta disminució en la proliferació podria ser el resultat de la inhibició de l'expressió de proteïnes reguladores del cicle cel·lular<sup>68</sup>.

Els efectes antineoplàsics més importants produïts per aquests greixos han estat la seva capacitat d'induir marcadament la mort cel·lular programada o apoptosi.

Així, hem pogut demostrar que tan l'oli de peix com el d'oliva indueixen de manera molt dràstica l'apoptosi en les dues línies cel·lulars estudiades. Els canvis morfològics característics de l'apoptosi van ser observats a partir de les 48 hores postsuplementació. En aquell moment ja veiem un elevat nombre de cèl·lules apoptòtiques amb cromatina condensada i presència de cossos apoptòtics. Per altra banda, hi ha una disminució molt destacada del nombre de cèl·lules totals. La pèrdua cel·lular és molt

superior al nombre de cèl·lules apoptòtiques detectades al moment de fer l'anàlisi. Aquest fet indica que moltes d'aquestes cèl·lules apoptòtiques ja no les hem pogut detectar perquè estan desintegrades com a resultat final de l'apoptosi.

Quan analitzem l'efecte de la suplementació amb els àcids grassos DHA i EPA (presentes en l'oli de peix), podem veure que aquests tenen gran capacitat d'inducció de l'apoptosi. A les 24 hores de tractament, ja observem formació de cossos apoptòtics i condensació de la cromatina, mentre que amb l'oli de peix aquests canvis els detectem principalment a les 48 i 72 hores posteriors al suplement. L'efecte molt més ràpid i potent dels àcids grassos respecte l'oli, podria ser degut a la existència de diferents components presents en l'oli de peix que contrarestarien l'efecte dels àcids. Alguns estudis reporten un efecte antiapoptòtic d'alguns antioxidants presents en l'oli de peix<sup>28</sup>. Una altre motiu que podria explicar la diferència entre l'efecte dels àcids grassos i de l'oli de peix, seria que aquests s'administren al cultiu cel·lular en la seva forma lliure i així podrien exercir la seva acció de forma molt més directa. Així doncs, d'acord amb els postres experiments, sembla que serien els àcids grassos presents en l'oli de peix els principals responsables de l'estimulació de l'apoptosi.

Mentre que la inducció de l'apoptosi per part de l'oli d'oliva és clara en les dues línies cel·lulars utilitzades, no podem afirmar que aquest efecte sigui degut únicament a la presència de l'àcid oleic. En el cas de les cèl·lules Caco-2, l'apoptosi induïda per l'àcid oleic és força menor que la produïda per l'oli d'oliva. És important destacar que és el primer cop que es descriu un efecte inductor de l'apoptosi per part d'oli d'oliva en cèl·lules de càncer de còlon.

En la inducció de l'apoptosi, hi ha involucrades dues vies principals; la via del receptor de mort cel·lular o via extrínseca i la via de la mitocòndria o via intrínseca<sup>28,29</sup>. Un dels elements claus en tot el procés apoptòtic i majoritàriament en la via de la mitocòndria, són els membres de la família de Bcl-2. Dins d'aquesta família, trobem proteïnes antiapoptòtiques i proapoptòtiques. Les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak semblen ser

essencials per a l'activació de la via mitocondrial en permetre la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'alliberament del citocrom-c<sup>30</sup>. L'activació d'aquestes proteïnes proapoptòtiques està regulada per les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>, les quals segresten Bax i Bak <sup>30</sup>.

En l'apoptosi induïda pel DHA en les cèl·lules de càncer de còlon, la proteïna Bax té una clara implicació. Aquesta dependència l'hem demostrat en observar una disminució significativa de l'apoptosi en cultius cel·lulars on s'ha afegit, al mateix moment que el suplement de DHA, un inhibidor específic d'aquest. A l'estudiar els possibles efectes a nivell d'expressió gènica de Bax, no s'observen canvis significatius respecte el control. És a nivell de la proteïna Bax que es produeix la regulació de l'apoptosi produïda pel DHA. Per altra banda, a nivell d'expressió de RNA missatger, els gens de Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub> semblen tenir un paper poc destacat en la regulació de l'apoptosi observada. Ambdós casos presenten una lleugera inhibició de l'expressió, però pràcticament, sense ser significativa. Al determinar l'expressió proteica de Bcl-2, hem observat que tan l'oli de peix com l'oli d'oliva provoquen una important disminució de la seva expressió.

COX-2 forma part d'una classe de gens coneguts com a gens d'acció immediata. S'expressa de forma ràpida i transitòria després de l'estimulació amb factors de creixement, citocines i promotors tumorals<sup>69</sup>. Diferents estudis han demostrat que el mecanisme d'acció de COX-2 per facilitar la progressió tumoral involucra la proliferació cel·lular i l'apoptosi<sup>34,43,70</sup>.

Alguns estudis mostren una relació entre les proteïnes COX-2 i Bcl-2 i suggereixen que l'efecte antipoptòtic de COX-2 podria ser mediat per inducció de la proteïna Bcl-2<sup>34,43</sup>. En aquest estudi hem demostrat que l'oli de peix i l'oli d'oliva així com seus àcids grassos principals, provoquen una dràstica inhibició de COX-2, tan a nivell gènic com proteic, a les poques hores del tractament. Aquesta primerenca regulació negativa de

l'expressió de COX-2 ve acompanyada d'una posterior disminució de l'expressió de la proteïna Bcl-2.

En el model *in vivo* que hem utilitzat d'inducció de carcinogènesi colorectal, hem demostrat que l'oli d'oliva i l'oli de peix tenen un efecte protector en el desenvolupament del càncer colorectal. La diferència bàsica d'aquest estudi respecte a altres publicats, on s'observen alguns aspectes similars als nostres (sobretot referent a l'oli de peix), és la quantitat de grassa administrada. Mentre que, en la majoria d'estudis, els animals són alimentats amb un 15 o 20% de greix<sup>46, 71</sup>, en el nostre treball aquest és únicament del 5% (concentració típica del pinso comú). Per altra banda, amb aquest model experimental, estem valorant les fases inicials de la tumorogènesi, ja que amb el curt període que estan exposats els animals al carcinogen no és possible la formació de cap tipus de lesió tumoral. Hem observat que les rates tractades amb azoximetà i alimentades amb oli d'oliva i amb oli de peix presenten un important augment de l'apoptosi de les cèl·lules epitelials de còlon, fet que suggereix que ambdós podrien afectar decisivament les fases d'inducció del càncer colorectal. En aquest aspecte, estudis amb rates que van rebre una concentració molt superior de grasses, l'oli de peix prevenia la formació d'adductes en el DNA, característics de la fase d'iniciació<sup>72</sup>.

Cal destacar que l'oli de peix és capaç d'induir l'apoptosi del colonòcit de rates sanes. Aquest fet ens suggereix que possiblement aquest oli té la capacitat de modular el "turnover" de l'epiteli colònic. Així doncs, l'oli de peix podria tenir un efecte preventiu al produir una acceleració en la regeneració d'aquest epiteli i permetria evitar l'exposició prolongada de les cèl·lules als possibles mutàgens presents en la llum de l'intestí. Aquest efecte protector de l'oli de peix, altres autors també l'han postulat a l'observar una disminució en la proliferació cel·lular de persones sanes que van ingerir durant un període determinat un suplement d'oli de peix<sup>59</sup>.

Per altra banda, la inducció de l'apoptosi es produeix preferentment en la part basal de la cripta colònica. Aquest fet és de gran rellevància ja que

podria indicar que aquests olis tenen el seu efecte en les cèl·lules mare i no en cèl·lules que ja estan diferenciades o en el seu procés apoptòtic natural.

En resum, valorant tots els resultats en detall, podem concloure que són els àcids grassos presents en l'oli de peix els responsables dels efectes anticarcinogènics observats. Respecte l'oli d'oliva, tot i que aquest està implicat en la prevenció del càncer colorectal, no té la capacitat d'incidir en tots els mecanismes estudiats. Per altre banda no podem atribuir els efectes observats amb l'oli d'oliva únicament a l'àcid oleic.

## **VI. CONCLUSIONS**

- L'oli de peix té un important efecte protector en el desenvolupament del càncer colorectal, incidint de forma clara en els processos de diferenciació cel·lular, de proliferació cel·lular i d'apoptosi.
- La ingesta d'oli de peix indueix la diferenciació de les cèl·lules d'adenocarcinoma colorectal. El procés de la diferenciació cel·lular s'associa amb una menor capacitat agressiva per part del tumor.
- L'oli de peix produeix una dràstica inhibició de la proliferació cel·lular, afectant negativament el desenvolupament del càncer colorectal al frenar el creixement descontrolat de les cèl·lules tumorals.
- És en el procés apoptòtic on l'oli de peix té l'efecte més destacat, provocant una forta inducció de la mort cel·lular programada, a través de la regulació de proteïnes de la família Bcl-2. La proteïna proapoptòtica Bax està clarament implicada en l'estimulació de l'apoptosi.
- La destacada inhibició de l'enzim COX-2 és un element important en la inducció de l'apoptosi i en la inhibició de la proliferació cel·lular. La ràpida i forta inhibició de COX-2 precedeix la important davallada de l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2.
- Els efectes produïts per l'oli de peix podrien atribuir-se principalment als àcids grassos n-3 presents en aquest: l'àcid docosahexaenoic i l'àcid eicosapentaenoic.



- L'estimulació de l'apoptosi en l'epiteli colònic per part de l'oli de peix en un model animal d'inducció de la carcinogènesi colorectal ens indica que aquest podria afectar decisivament les fases d'inducció del càncer colorectal.
- L'oli de peix té la capacitat d'incidir en la regulació del epiteli colònic en individus sans a l'incrementar l'apoptosi basal. Per aquest motiu podem pensar que l'oli de peix podria ser un bon agent preventiu del càncer colorectal.
- La capacitat de l'oli d'oliva de modular el desenvolupament del càncer colorectal en un sistema *in vitro* és menys destacada que la de l'oli de peix.
- L'oli d'oliva és capaç d'induir l'apoptosi de l'epiteli colònic en un model animal d'inducció de carcinogènesi colorectal i així modular el desenvolupament del càncer colorectal

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48:6-29.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.
3. Esteve J, Krickler A, Parkin DM. Facts and figures of colon cancer in the European Community. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1993.
4. Tominaga S, Aoki K, Fujimoto I, Kurihara M. Cancer mortality and morbidity statistics: Japan and the world. Boca Raton, FL: CRC press, 1994.
5. Ji BT, Devesa SS, Chow WH, Jin F, Gao YT. Colorectal cancer incidence trends by subsite in urban Shanghai, 1972-1994. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:661-6.
6. McMichael AJ, Giles GG. Cancer in migrants to Australia: extending the descriptive epidemiological data. *Cancer Res* 1988; 48:751-6.
7. Kim Y-I. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000; 118:1235-1257.
8. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 1996:717-735.
9. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 1993; 15:499-545.
10. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-32.
11. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.
12. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-3.
13. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386:623-627.
14. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, et al. Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor b Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1995; 55:5548-5550.

15. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996; 382:499-500.
16. Souza RF, Appel R, Yin J, et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 1996; 14:255-7.
17. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967-9.
18. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. *Nature Medicine* 1999; 5:1239-1241.
19. Force BNFsT. Unsaturated fatty acids: Nutritional and physiological significance. London: Chapman & Hall, 1992.
20. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:343S-8S.
21. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001; 36:1007-24.
22. Barnard JA, Warwick G. Butyrate Rapidly Induces Growth Inhibition and Differentiation in Ht-29 Cells. *Cell Growth & Differ* 1993; 4:495-501.
23. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985; 101:838-51.
24. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107:3569-3577.
25. Ansari B, Hall PA. The kinetic organization of tissues. In: Hall PA, Levison DA, Wright NA, eds. *The assessment of cell proliferation in clinical practice*. Berlin: Springer Verlag, 1992.
26. Wyllie AH. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res* 1985; 5:131-136.
27. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased Apoptosis Accompanies Neoplastic

- Development in the Human Colorectum. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1999-2006.
28. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:277-88.
  29. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:647-56.
  30. Spierings D, McStay G, Saleh M, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005; 310:66-7.
  31. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491-501.
  32. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:145-82.
  33. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of Cyclooxygenase 2 Gene Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107:1183-1188.
  34. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58:362-6.
  35. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3336-40.
  36. Tsuji N, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93:705-716.
  37. Labayle D, Fischer D, Vielh P, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1991; 101:635-9.
  38. Nugent KP, Farmer KC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal

- and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1993; 80:1618-9.
39. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328:1313-6.
  40. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996; 56:2556-60.
  41. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 1993; 14:1493-7.
  42. Oshima M, Murai (Hata) N, Kargman S, et al. Chemoprevention of Intestinal Polyposis in the *Apc*<sup>D716</sup> Mouse by Rofecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Cancer Res* 2001; 61:1733-1740.
  43. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83:493-501.
  44. AICR. Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Panel on Food. Nutrition and the prevention of cancer: American Institute for Cancer Research, 1997:216-251.
  45. Rao CV, Hirose Y, Indranie C, Reddy BS. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. *Cancer Res* 2001; 61:1927-33.
  46. Chang WL, Chapkin RS, Lupton JR. Fish oil blocks azoxymethane-induced rat colon tumorigenesis by increasing cell differentiation and apoptosis rather than decreasing cell proliferation. *J Nutr* 1998; 128:491-7.
  47. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary Fat and Colon Cancer: Modulating Effect of Types and Amount Of Dietary Fat on *ras*-p21 Function during Promotion and Progression Stages of Colon Cancer. *Cancer Res* 1997; 57:253-258.

48. Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, et al. Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and-9 activities. *Int J Cancer* 1997; 73:607-612.
49. Reddy BS, Simi B, Patel N, Aliaga C, Rao CV. Effect of Amount and Types of Dietary Fat Intestinal Bacterial 7  $\alpha$ -Dehydroxylase and Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C and Colonic Mucosal Diacylglycerol Kinase and PKC Activities during Different Stages of Colon Tumor Promotion. *Cancer Res* 1996; 56:2314-2320.
50. Reddy BS, Burill C, Rigotty J. Effect of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids on initiation and postinitiation stages of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51:487-91.
51. Weisburger JH. Causes, relevant mechanisms, and prevention of large bowel cancer. *Semin Oncol* 1991; 18:316-36.
52. Caygill CP, Charlett A, Hill MJ. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer* 1996; 74:159-64.
53. Trichopoulou A, Vasilopoulou E. Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr* 2000; 84:S205-9.
54. Cruz JA. Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe--Southern Europe. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:S29-35.
55. [Consumption patterns and the principal sources of lipids and fatty acids in the Spanish cohort of the European Prospective Investigation on Diet and Cancer (EPIC). The EPIC Group in Spain]. *Med Clin (Barc)* 1999; 112:125-32.
56. Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:85-90.
57. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz G, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323:1664-1672.
58. Latham P, Lund EK, Johnson IT. Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and

- suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon. *Carcinogenesis* 1999; 20:645-650.
59. Bartram H-P, Gostner A, Scheppach W, et al. Effect of Fish Oil on Rectal Cell Proliferation, Mucosal Fatty Acids, and Prostaglandin E<sub>2</sub> Release in Healthy Subjects. *Gastroenterology* 1993; 105:1317-1322.
  60. Calviello G, Palozza P, Maggiano N, et al. Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis are Modified by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Normal Colonic Mucosa. *Lipids* 1999; 34:599-604.
  61. Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2001; 19:1255-62.
  62. Stoneham M, Goldacre M, seagroarr V, Gill L. Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and hypothesis. *J Epidemiol Community Health* 2000; 54:756-760.
  63. Macquart-Moulin G, Riboli E, Cornee J, Charnay B, Berthezene P, Day N. Case-control study on colorectal cancer and diet in Marseilles. *Int J Cancer* 1986; 38:183-91.
  64. Reddy BS, Maeura Y. Tumor promotion by dietary fat in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in female F344 rats: influence of amount and source of dietary fat. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:745-50.
  65. Bartolí R, Fernández-Bañares F, Navarro E, et al. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *Gut* 2000; 46:191-199.
  66. Salerno JW, Smith DE. The use of sesame oil and other vegetable oils in the inhibition of human colon cancer growth *in vitro*. *Anticancer Res* 1991; 11:209-216.
  67. Iigo M, Nakagawa T, Ishikawa C, et al. Inhibitory effects of docosahexaenoic acid on colon carcinoma 26 metastasis to the lung. *Brit J Cancer* 1997; 75:650-655.



68. Chen ZY, Istfan NW. Docosahexaenoic acid, a major constituent of fish oil diets, prevents activation of cyclin-dependent kinases and S-phase entry by serum stimulation in HT-29 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 64:67-73.
69. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99:2254-9.
70. Öhd JF, Wikström K, Sjölander A. Leukotrienes Induce Cell-Survival Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* 2000; 119:1007-1018.
71. Paulsen JE, Stamm T, Alexander J. A Fish Oil-Derived Concentrate Enriched in Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid as Ethyl Esters Inhibits the Formation and Growth of Aberrant Crypt Foci in Rat Colon. *Pharmacology & Toxicology* 1998; 82:28-33.
72. Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, et al. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. *Cancer Res* 2004; 64:6797-804.

## **VIII. ABREVIATURES**

---

AOM	Azoximetà
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BSA	Albúmina lliure d'àcids grassos
COX	Ciclooxigenasa
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHA	Àcid docosaheptaenoic
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DPPIV	Dipeptidilpeptidasa IV
EPA	Àcid eicosapentanoic
FCS	Sèrum fetal boví
FO	Oli de peix
GSB	Tampó de carrega per proteïnes
h	Hores
IA	Índex d'apoptosi
K-8	Queratina 8
LA	Àcid linoleic
µl, µg	Microlitre, microgram
OA	Àcid Oleic
OO	Oli d'oliva
PBS	Tampó Fosfat Salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PMME	Membrana mitocondrial externa
RNA	Àcids ribonucleic
RT	Retrotranscripció
RT-PCR	Retrotranscripció més reacció en cadena de la polimerasa
RT_PCR	Reacció en cadena de la polimerasa a temps real
S-I	Sucrasa-Isomaltasa