

CAPÍTOL 5. ELS AGPI A LA CARCINOGENÈSI COLORECTAL.

5. 1. INTRODUCCIÓ.

La majoria d'estudis epidemiològics, discutits àmpliament al capítol 2, no arriben a mostrar una associació significativa entre la quantitat total de greix de la dieta, ajustada a la ingesta calòrica, i el risc de desenvolupar càncer colorectal. Malgrat això, els estudis observacionals en humans junt amb els coneixements actuals sobre la regulació genètica i epigenètica de l'activitat cel·lular per part de les diferents famílies d'AG fan considerar la possibilitat que algun subtipus de greix estigui relacionat amb el càncer colorectal.^{83,245,308,483}

Essencialment, existeixen poques dades pel que fa a la ingesta d'AG específics. En aquest sentit, una de les principals limitacions és l'estimació de la ingesta de determinats AG a la dieta humana.^{78,144} Com exemple d'això, destacar la complexitat que representa la caracterització exhaustiva del contingut lipídic dels diferents aliments, greixos i olis, les mescles d'aquests i les modificacions pels processos de transformació industrial i preparació culinària. Així doncs, si a les consideracions anteriors afegim aspectes metabòlics com la síntesi endògena dels AG, l'estudi dels efectes d'un determinat AG comporta un elevat grau de dificultat. No obstant això, les evidències actuals de l'efecte de les diferents famílies lipídiques sobre la carcinogènesi colorectal es basen en l'extrapolació del contingut d'AG de determinats olis i greixos integrants habituals de les dietes humanes.

Les principals fonts d'AG de la dieta humana estan detallades a la **figura 5.1**. Com pot observar-se, els AGS, principalment l'àcid palmític i l'àcid esteàric, són d'origen animal. Les fonts de l'àcid oleic, l'AGMI més freqüent a la dieta humana, són l'oli d'oliva i l'oli de canola, malgrat que també esta proporcionalment elevat

en els greixos d'origen animal. L'AGPI més abundant és l'àcid linoleic, aquest prové d'olis vegetals com el gira-sol, blat de moro i soia. Mentre els greixos vegetals amb un contingut més elevat d'àcid ω -linolènic, AGPI essencial de la sèrie n_3 , són els olis de llinosa, canola i nous. Els olis de peix constitueixen la font més important d'AGPI n_3 de cadena llarga, EPA i DHA, de l'alimentació humana. Addicionalment, la dieta humana incorpora una proporció d'isòmers dels AG insaturats de forma natural o pels processos de preparació alimentaria, aquest és el cas de l'àcid linoleic conjugat o els AG insaturats de configuració *trans*, respectivament.^{29,217}

Com s'ha esmentat al capítol 2, els estudis epidemiològics mostren majoritàriament una associació positiva entre el consum de grassa saturada d'origen animal, principalment de la carn vermella, i el càncer colorectal.^{57,144,176,256,329,529} D'altra banda, el consum d'altres fonts de greix animal com l'aviram, peix i la llet no s'han relacionat amb un augment del risc de patir una neoplàsia colorectal; fins i tot apareixen estudis on s'observa un efecte beneficiós d'aquestes fonts de greix animal sobre aquest tipus de càncer.¹⁷⁶ Pel que fa a l'oli de peix, la majoria d'estudis que evidencien un efecte protector de la ingesta d'aquest oli sobre la carcinogènesi colorectal suggereixen que aquestes accions són degudes a la incorporació d'AGPI de cadena llarga de la sèrie n_3 .^{29,52,529}

El principal AG dels olis vegetals consumits als EEUU i a l'Europa occidental és l'àcid linoleic, aquest constitueix aproximadament entre el 6 i el 7% de l'energia d'aquestes dietes, mentre que a països com Israel i Bèlgica pot arribar a representar entre el 8 i 12%.⁵⁴⁶ Un recent meta-anàlisi realitzat sobre estudis cas-control, cohorts i de comparacions entre poblacions mostra, majoritàriament, una nul la associació entre el la ingesta d'àcid linoleic i el risc de càncer colorectal.⁵⁴⁶ D'altra banda, el consum d'isòmers *trans* d'AG a partir de la hidrogenació parcial d'olis vegetals és elevat als països esmentats en forma de margarines, mantegues, maioneses i pastissos. Malgrat haver-hi poques evidències, l'actuació dels *trans*-

AG no sembla ésser un factor important de risc en el desenvolupament tumoral colorectal.^{176,217}

Els estudis ecològics de comparació entre regions evidencien una menor incidència en el càncer colorectal i de mama entre els països de l'àrea mediterrània que als Estats Units d'Amèrica i al nord d'Europa.^{13,440,477} Aquest efecte s'ha relacionant amb l'ingesta greix dietètic en forma d'oli d'oliva. L'oli d'oliva és la font principal d'àcid oleic a països com Grècia, Itàlia i Espanya, mentre que als Estats Units, l'àcid oleic prové d'una àmplia varietat d'aliments entre els que es troben les carns (riques en AGS).⁷⁸ De fet, malgrat existir un consum similar de greix total entre els Estats Units i Grècia (40% de l'energia total), les taxes en la incidència de càncer colorectal per cada 100.000 habitants eren al 1960 d'11 i 3, respectivament.²⁵⁶ En aquest sentit, s'ha suggerit que la font dels AGMI possiblement tingui una influència sobre les diferències observades a la incidència de càncer colorectal entre les regions esmentades.¹⁷⁶

En definitiva, les evidències actuals són escasses pel que fa a l'estudi de la influència de determinats tipus d'AG sobre el càncer colorectal. Malgrat això, les observacions obtingudes fins ara, basades en les diferents fonts de greix i oli, no menystenen la possibilitat d'accions diferencials entre les diverses famílies d'AG. En aquest sentit, tot i que la epidemiologia nutricional s'ha de considerar rellevant al realitzar els estudis sobre l'ésser humà, aquesta eina científica topa amb una sèrie de limitacions que poden esdevenir en una visió esbiaixada dels resultats. Concretament, pel que fa a l'estudi de la influència dels AG insaturats a la carcinogènesi colorectal un dels principals obstacles dels estudis epidemiològics, tal i com s'ha esmentat anteriorment, són els mètodes d'estimació del contingut d'AG específics de la dieta humana: variació del comportament dietètic dels individus al llarg de l'estudi, baixa sensibilitat dels qüestionaris emprats per mesurar la ingesta de determinats nutrients i baixa especificitat de les bases de dades d'on s'extreu el contingut de les diferents famílies d'AG dels aliments.^{78,144} A més, aspectes metodològics dels estudis en humans poden comportar

problemes en l'anàlisi del caràcter protector o promotor de determinats AG vers a la carcinogènesi colorectal: obviar factors dietètics (micronutrients, fibra, alcohol) i no dietètics (activitat física, tabaquisme, edat, pes, status hormonal i genètic dels individus) que poden interferir en el metabolisme dels AG, no tenir en compte l'aport energètic de la dieta, elecció poc adient dels controls sans, impossibilitat de substituir totalment de la dieta un determinat AG i l'ús de biomarcadors de promoció i progressió tumoral que no han estat suficientment validats.¹⁴⁴ Els treballs experimentals amb animals, d'altra banda, permeten dissenys experimentals més rigorosos en l'estudi de les relacions entre les diferents famílies lipídiques i l'oncogènia colònica, obviant variables que poden afectar els resultats dels estudis epidemiològics.

5.2. ESTUDIS D'INTERVENCIÓ DIETÈTICA.

Els estudis d'intervenció tenen l'avantatge sobre els estudis observacionals que poden ser aleatoritzats i poden establir sòlides associacions entre la dieta i la malaltia. No obstant això, apart de les limitacions ètiques, econòmiques i de compliment, aquests estudis valoren els efectes de la manipulació dietètica a curt termini sobre paràmetres fisiològics que estan relacionats amb el risc de patir una malaltia determinada. En aquest context, els estudis d'intervenció en patologies tumorals topen amb la incertesa de l'elecció d'un biomarcador adient davant el relatiu desconeixement de la seqüència d'esdeveniments fisiològics que comporta la carcinogènesi. Addicionalment, quan els AG són administrats en forma de suplementes, les observacions poden ser esbiaixades per la interferència d'altres factors dietètics i l'estil de vida.¹⁴⁴

Pocs estudis d'intervenció han estat realitzats per valorar la influència de les diferents famílies d'AG sobre el càncer colorectal. Dietes amb un alt contingut d'àcid linoleic han estat utilitzades en estudis d'intervenció per determinar la seva relació amb patologies coronàries, addicionalment, aquests estudis també aporten dades sobre l'aparició de patologies neoplàsiques.⁵⁴⁶ Els resultats obtinguts en

aquests treballs de recerca no evidencien un clar augment en el nombre de casos de càncer entre els individus que consumeixen una elevada quantitat d'àcid linoleic després d'un seguiment entre 1 i 7 anys. D'altra banda, un estudi controlat realitzat en malalts amb pòlips adenomatosos colorectals esporàdics avaluà l'efecte de la suplementació amb diferents dosis d'oli de peix sobre la hiperproliferació rectal que presenten aquests pacients.¹¹ Les dosis baixes d'oli de peix utilitzades en aquest estudi (2,5 i 5,1 g/dia) van ser suficients per normalitzar la proliferació epitelial a la mucosa rectal dels malalts, tant als 30 com als 180 dies de tractament, el que suggereix un efecte beneficiós de l'oli de peix en individus amb un elevat risc de patir una neoplàsia colònica. Efectes similars de l'oli de peix sobre la proliferació cel·lular rectal han estat observat en individus sans.²⁸

Com s'ha esmentat prèviament, un dels principals inconvenients dels estudis epidemiològics és conèixer amb exactitud l'ingesta d'un determinat nutrient. La valoració del perfil d'AG al plasma o en teixit podria aportar una informació més precisa sobre la ingesta dels diferents greixos dietètics. Estudis d'intervenció dietètica sobre patologies intestinals han mostrat com la suplementació amb oli de peix o oli d'oliva alteren el perfil d'AGPI a la mucosa colònica.²⁰⁰ Aquests canvis consisteixen principalment en un augment en els nivells dels AGPI de cadena llarga de la sèrie n3 i un descens de l'AA per la suplementació l'oli de peix, mentre que l'oli d'oliva eleva nivells d'àcid oleic i redueix els àcids esteàric i docosahexaenoic. Addicionalment, també s'ha observat que la incorporació dels AG a partir de l'oli de peix és més ràpida que no pas a partir de l'oli d'oliva.

En definitiva, els estudis intervencionals existents fins ara aporten poques dades sobre les relacions entre els AGPI i la carcinogènesi colònica humana. D'altra banda, l'ús de biomarcadors intermediaris, limita la valoració dels resultats ja que a l'actualitat no estan del tot relacionats amb el procés carcinogènic.

5.3. ESTUDIS AMB ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

Des de fa més de 50 anys els estudis amb animals d'experimentació han evidenciat que dietes amb un alt contingut de greix, i per tant amb un elevat aport calòric, s'assoïcen al desenvolupament d'alguns tipus de tumors més ràpidament que les dietes amb un baix contingut lipídic.⁴⁹¹ En les darreres dècades, els estudis de carcinogènesi experimental han dirigit l'atenció cap l'efecte de les diferents famílies d'AG.

Els estudis experimentals amb animals ofereixen la possibilitat de controlar el contingut lipídic de la dieta i les interaccions amb altres nutrients de la dieta com la fibra, el calci i els antioxidants. Les recomanacions dietètiques pel que fa al contingut de greix respecte al total de nutrients de la dieta pels rosegadors s'ha xifrat al voltant d'un 5% amb un requeriment mínim d'AG essencials, àcids linoleic i α -linolènic.⁴¹⁰ També s'ha considerat que quantitat mínima d'AG essencials necessària per induir tumors colònics a la rata ha d'estar al voltant de l'1% del total energètic.⁵⁴⁶ Als estudis de carcinogènesi experimental podem trobar un ampli ventall pel que fa al contingut total de greix de la dieta que oscil·la entre el 3 i el 30%. Sent les dietes amb un més alt contingut de greix les que mostren una elevada incidència de tumors colònics.^{73,203,261,407,520} A la vegada, també s'ha suggerit que l'espècie molecular lipídica (fosfolípids, triglicèrids, AG lliures) administrada en la dieta pot tenir diferents efectes sobre la carcinogènesi experimental.¹³⁹

Els models animals de carcinogènesi colònica induïda químicament han demostrat una elevada incidència de càncer colònic en rates alimentades amb dietes que contenen un 20% de greix de fonts com l'oli de blat de moro, oli de girasol, oli de cànham, llard i seü respecte a les alimentades amb un 5% de greix.^{247,392,400,401,407} Aquest efecte promotor no s'ha observat quan el contingut de greix de la dieta prové de l'oli d'oliva, oli de peix, oli de coco i d'isòmers *trans* dels AG.^{312,399,400,404,407} No obstant això, cal esmentar l'existència d'estudis on els efectes

dels diferents subtipus greix sobre la carcinogènesi colònica no estan tant clars, apareixent diferències segons la soca i/o sexe dels animals (principalment rates i ratolins) i amb el carcinogen emprat.^{75,247,406} A més, també poden aparèixer discrepàncies segons els olis utilitzats com a controls en els experiments.

A continuació es detallen les evidències més rellevants obtingudes dels estudis experimentals amb animals basats en la formació de lesions preneoplàssiques i tumors. Aquests estudis mostren que l'efecte protumoral no solament depèn de la quantitat de greix dietètic sinó també de la diferent composició d'AG. En general, les dietes basades en AGPI de la sèrie n6 (oli de blat de moro, càrtam, gira-sol) afavoreixen la carcinogènesi colònica, particularment a la fase promocional,^{73,75,399,407,546} mentre que dietes amb oli de peix (AGPI n3) minven la incidència tumoral colònica tant a la fase d'iniciació com a la de promoció.^{75,407} En aquest sentit, i contràriament als AGPI de la sèrie n6, els AGPI n3, ja siguin administrats com a components grassos de la dieta o en forma de suplement, tenen la capacitat de reduir la hiperproliferació epitelial colònica, la formació de FCA i minvar el nombre i el grau de malignitat dels tumors.^{94,266,485,486} Pel que fa als AGMI i AGS, els resultats obtinguts fins ara mostren efectes intermedis. Així apareixen estudis on una elevada quantitat d'oli de coco (20%), ric amb AGS de cadena mitja, promou la carcinogènesi colorectal induïda per AOM en rates respecte a la mateixa proporció d'oli de peix;¹⁹⁷ mentre que si l'oli de coco es compara amb olis de blat de moro o de càrtam l'efecte és el contrari.⁴⁰⁷

Altres estudis demostren un descens a la incidència i multiplicitat tumoral colònica en rates alimentades amb àcid esteàric (C18:0) respecte a les alimentades amb àcid linoleic.⁴²⁶ També s'ha observat que el sèu de bòvid té un efecte protumoral més important que el llard de porc, suggerint-se que malgrat la similar composició d'AG dels dos greixos animals, la distribució d'aquests a la molècula de triacilglicèrid pot comportar diferents respostes fisiològiques.²⁴⁷ D'altra banda, els estudis que investiguen l'efecte dels AGMI sobre la carcinogènesi colònica utilitzen oli d'oliva o de càrtam modificat genèticament els quals contenen entre

un 70 i un 80% d'àcid oleic. La majoria d'aquests estudis han descrit un efecte protumoral reduït de les dietes amb una elevada quantitat d'àcid oleic (>20%) quan es comparen en dietes amb la mateixa proporció d'àcid linoleic.^{400,489} No obstant això, a la literatura apareixen dades on no s'observa un efecte protector de l'àcid oleic a la carcinogènesi experimental quan es compara amb l'àcid -linolènic.²⁴⁸ Respecte a això, l'estudi d'un determinat tipus de greix sobre la carcinogènesi colònica podria veure's influenciat pels greixos escollits com a controls; és a dir, els resultats podrien ésser diferents si les comparacions fossin fetes respecte a AGPI de la sèrie n3 o a AGPI de la sèrie n6.

Estudis recents aporten dades sobre l'efecte de l'administració de diferents taxes d'AGPI n6/AGPI n3 a la carcinogènesi animal. Així, en comparació a l'oli de càrtam (70% d'àcid linoleic i 0,1% d'àcid -linolènic) i a l'oli de soia (50% d'àcid linoleic i 5% àcid -linolènic), l'oli de perilla (15% d'àcid linoleic i 65% àcid -linolènic) té un efecte preventiu sobre la formació de tumors de mama, colon i ronyó.²⁹⁵ En aquest sentit, estudis anteriors evidencien que a mesura que es disminueix el balanç dietètic d'oli de blat de moro/oli de peix es produeix un descens equivalent de la proporció AGPI n6/AGPI n3 a la mucosa i als tumors colònics de rates tractades amb carcinogen, el que es tradueix en un significatiu descens de la incidència tumoral respecte a les rates que van ser alimentades exclusivament amb oli de blat de moro.⁴⁰⁷ Així doncs, aquests estudis suggereixen que la incorporació d'AGPI n3 a una dieta rica amb AGPI n6 provoca l'aparició de fenòmens de competició metabòlica entre les dues famílies lipídiques amb el consegüent benefici sobre el desenvolupament oncogènic.

D'altra banda, mentre que la majoria d'estudis en rates han avaluat l'efecte de dietes hipercalòriques per l'alt contingut de greix (de 15% al 20% del total de la dieta), hi ha pocs que hagin estudiat l'efecte de la composició lipídica de dietes amb un 5% de greix.^{312,426} Des d'un punt de vista individual, aquests estudis semblen més fisiològics doncs utilitzen dietes normolipídiques per les rates tal i com s'ha esmentat anteriorment.

No hi ha gaires estudis que avaluïn l'efecte dels diferents AG en models experimentals de trasplantament de cèl·lules tumorals a ratolins immunodeprimits o en ratolins que desenvolupen espontàniament tumors intestinals per ser portadors d'una mutació heterozigòtica en *Apc*. Ambdós models mostren efectes similars als observats en els models de carcinogènesi induïda químicament. Així l'oli de peix o la suplementació amb EPA inhibeix el creixement de cèl·lules tumorals implantades al budell dels ratolins en comparació en dietes riques amb àcid linoleic, AGS i àcid oleic.^{54,82,88} En el mateix sentit, quan es va afegir un 3% de DHA a una dieta que contenia un 5% d'oli de blat de moro es va produir una reducció significativa en el nombre i en la mida dels pòlips intestinals desenvolupats per femelles de ratolins transgènics, però no en els mascles.³⁵⁰

Tots aquests estudis suggereixen, per tant, que la composició lipídica del greix dietètic és un factor important a la carcinogènesi colònica. A continuació es revisaran els coneixements actuals sobre els possibles mecanismes d'acció.

5.4. ACCIONS DELS AGPI SOBRE ELS MECANISMES MOLECULARS I CEL·LULARS A LA CARCINOGENÈSI COLORECTAL.

Tal i com s'ha vist en els apartats anteriors, la majoria d'estudis suggereixen una diferent capacitat de modular el procés neoplàsic segons el tipus d'AG dietètic administrat. Els estudis experimentals *in vitro* i *in vivo* aporten informació addicional de la influència dels greixos dietètics sobre biomarcadors carcinogènics. Malgrat que els treballs experimentals *in vitro* constitueixen una poderosa eina per estudiar els mecanismes cel·lulars, en aquest apartat s'esmentarà principalment els resultats d'estudis experimentals de carcinogènesi colònica amb animals per evidenciar la complexitat de la funció cel·lular en un sistema *in vivo*. A més, cal tenir en compte que la majoria d'estudis realitzats fins ara comparen l'administració d'AGPI de la sèrie n6 amb els de la sèrie n3 (oli de peix), sense que apareguin gaires treballs on s'avaluï efectes sobre la carcinogènesi fent servir altres

fonts com l'oli de perilla (AGPI n3), l'oli d'oliva (AGMI) o l'oli de canola (AGMI i AGPI n3).

5.4.1. Expressió de gens i oncògens.

Tot i les evidències existents a l'actualitat sobre les alteracions genètiques que acompanyen el procés tumoral, relativament pocs treballs han centrat les seves investigacions en esbrinar com els diferents AG activen o regulen l'expressió gènica.

La modulació de l'expressió de gens o variants oncogèniques d'aquests per lípids bioactius s'ha evidenciat en cultius cel·lulars i en models experimentals de càncer de mama i colon. Estudis *in vitro* amb cèl·lules de la musculatura llisa vascular i fibroblasts han observat que els AGPI de la sèrie 6 o metabòlits derivats d'aquests indueixen l'expressió de *c-fos*, *c-myc* i *c-jun*, els quals poden estar relacionats amb la proliferació cel·lular.^{396,439} Addicionalment, cultius de cèl·lules colòniques normals i tumorals humanes han reportat que la PGE₂ i el LTB₄ augmenten l'expressió del protooncogen Bcl-2, que s'associa amb un descens de l'apoptosi.^{344,444} Models amb animals d'experimentació han evidenciat que l'administració d'AGPI de la sèrie n3 redueix l'expressió del protooncogen *ras* als nòduls alveolars hiperplàssics mamaris i al teixit mamari de rates sanes en comparació amb els AGPI de la sèrie n6.^{21,493} Aquest mateix efecte ha estat detectat en rates amb càncer de còlon induïdes amb AOM on les accions antitumorals de l'oli de peix s'han suggerit que podrien ser degudes a una acció combinada sobre el gen *ras* reduint l'expressió del gen, la seva translocació a la membrana plasmàtica i, possiblement, la freqüència mutacional.^{123,453}

No es coneix amb precisió com els lípids actuen sobre l'expressió dels gens. Hi ha la possibilitat de que puguin actuar de forma indirecta a través de mecanismes de transducció de senyals, per exemple elevant els nivells intracel·lulars de Ca²⁺, activant proteïnes quinases o augmentant els nivells d'AMPc. Actualment les

investigacions sobre els mecanismes moleculars regulats pels lípids apunten la possibilitat de que existeixin accions directes sobre l'expressió de gens, i per tant, sobre l'expressió d'oncògens. En aquest sentit, destaquen la capacitat que mostren els AG o els seus metabòlits d'unir-se i activar factors de transcripció gènica com són els receptors activadors de la proliferació de peroxisomes.^{138,354,445,511}

Finalment, la peroxidació lipídica genera metabòlits que poden lesionar diferents macromolècules.¹⁵² Així productes provinents del metabolisme oxidatiu de l'àcid linoleic i l'AA com malondialdehid o els α , ω -aldehyds insaturats poden interaccionar amb els nucleòtids de l'ADN formant estructures exocíclics promutagèniques.²⁹ D'aquesta manera, la ingesta d'AGPI de la sèrie n6 podria relacionar-se amb un augment de la capacitat mutacional.

5.4.2. Senyals intracel·lulars.

5.4.2.1. Proteïna quinasa C.

Tal i com s'ha esmentat en el capítol anterior, tant l'activació com la distribució intracel·lular dels diferents isoenzims de PKC estan alterades durant el procés neoplàsic. De fet, les isoformes d'aquesta proteïna fosforilativa poden tenir respostes fisiològiques ben diferents l'una de l'altra, tant en l'homeostasi com a l'oncogènesi colorectal.

Els isoenzims de PKC són regulats per una ampla varietat d'espècies lipídiques d'una manera més o menys específica. Així, a més del DAG, concretament *sn*-1,2-DAG, AG com l'AA, l'àcid oleic, l'DHA i l'EPA, cooperen en l'activació de les PKC convencionals (α , I, II,) a concentracions micromolars de Ca^{2+} .^{281,245,447} A més, l'inositol (3,4)-bifosfat i l'inositol (3,4,5)-trifosfat es mostren com potents activadors de PKC- α , - β i - γ , i en menor grau de la PKC- δ .²⁸¹ Addicionalment, productes provinguts de l'acció de la PLA₂ com la lisofosfastidilcolina també tenen la capacitat d'estimular els isoenzims convencionals de PKC, però a la vegada, poden inhibir l'activitat de les PKC- β i - δ .²⁸¹ Aquestes evidències suggereixen que

la manipulació lipídica de la dieta pot exercir una regulació exògena sobre de les PKC i per tant influir sobre la funció cel lular sota el control d'aquests enzims.

En els primers estudis experimentals s'avaluava com una ingesta elevada en greix influïa en l'activat de la PKC sense distingir entre els diferents isoenzims que integren aquesta família proteica. Aquests estudis suggerien que l'activació crònica de la PKC era conseqüència de l'augment d'àcids biliars i DAG intracolònics el que podria correlacionar-se amb un estat hiperproliferatiu a les criptes colòniques.^{110,169} En relació amb aquesta hipòtesi, altres grups observen, en models animals de carcinogènesi colònica, una disminució de l'activitat de la PKC si les dietes contenen una elevada quantitat d'oli de peix respecte a dietes amb un elevat contingut d'oli de blat de moro.^{327,403} No obstant això, sembla que als estadis avançats de la carcinogènesi, quan existeix un descens en l'activitat de la PKC, la manipulació dietètica de l'activitat de la PKC es mostra ineficaç.³²⁷

Actualment, treballs amb animals han mostrat que l'administració d'AOM provoca un descens en els nivells proteics al colon de PKC- α , - β i - γ , i un augment de la PKC- II a mesura que evoluciona la carcinogènesi.^{121,225,226,518} L'administració de dietes amb oli de peix reverteix aquests efectes de la carcinogènesi experimental sobre els diferents isoenzims de PKC, mentre que l'oli de blat de moro els manté o augmenta. Addicionalment, l'expressió de l'ARNm d'aquests isoenzims no està modificada per la dieta, el que suggereix un nivell de regulació posttranscripcional.^{225,226}

Les evidències anteriors argumenten a favor de que l'acció protectora dels AGPI de la sèrie n3 pot ser en part deguda a un bloqueig en l'augment de DAG intracel lular provocat pel carcinogen. Aquesta acció prevé l'activació persistent i la disminució crònica dels diferents isoenzims que integren la PKC.⁹⁶ D'aquesta manera el manteniment dels nivells de PKC es tradueix en un equilibri homeostàtic entre la proliferació, diferenciació i apoptosi cel lular que pot prevenir el desenvolupament neoplàsic.

5.4.2.2. Tirosines quinases.

La fosforilació de residus de tirosina constitueix un mecanisme bàsic de modificació de la funció proteica associada als senyals de transducció que regulen el creixement i diferenciació de les cèl·lules eucariotes.¹⁸¹ L'activitat tirosina quinasa pot constituir una capacitat intrínseca dels dominis intracel·lulars de molts receptors de factors de creixement; d'altra banda, també existeixen proteïnes tirosina quinases citoplasmàtiques associades a estructures intracel·lulars.

Als colonòcits de rates sanes l'activitat de la tirosina quinasa unida al citoesquelet s'ha identificat a les zones proliferatives de les criptes, l'administració d'un carcinogen provoca l'expansió de l'activitat enzimàtica als compartiments superiors de la cripta.⁴³⁶ Addicionalment, altres estudis han demostrat que l'administració d'AOM en rates comporta una hiperactivitat tirosina quinasa associada als receptors cel·lulars que s'acompanya d'un augment de la proliferació a la mucosa colònica.²⁹⁰ En definitiva, aquests estudis identifiquen l'activitat tirosina com un procés altament relacionat amb la proliferació cel·lular al budell. Conseqüentment, variants oncogèniques d'aquests enzims provocarien un fenotipus hiperproliferatiu cel·lular.⁴¹⁶

A la carcinogènesi colònica experimental s'ha observat que dietes amb un alt contingut de greix (23,5%) que prové de l'oli de blat de moro augmenten l'activitat tirosina quinasa respecte a dietes amb un baix contingut (5%) d'aquest oli o en dietes amb un elevat contingut d'oli de peix i oli d'oliva.³⁹⁴

Els mecanismes pels que els AG actuen sobre l'activitat tirosina quinasa no es coneixen, però aquests enzims podrien estar sotmesos a una regulació físico-química per interaccions lípid-proteïna a la membrana plasmàtica de les cèl·lules.²⁴⁵

5.4.2.3. Altres quinases intracel·lulars.

Als darrers temps, l'estudi de la transformació oncogènica de les cèl·lules s'ha anat completant amb la descripció de passos intermedis de vies metabòliques relacionades amb la proliferació i diferenciació cel·lular. En aquest sentit, destaquen tot un seguit de serina/treonina quinases citoplasmàtiques associades a la transmissió d'estímuls des de la superfície fins el nucli de les cèl·lules. Un exemple il·lustratiu d'això el constitueix l'estimulació de la cascada Raf-1/MAP-quinases per la proteïna Ras activa.^{47,48} No obstant això, el potencial oncogènic de Ras no es basa exclusivament amb l'activació de la via de serina/treonina quinases esmentada, sinó també implica a proteïnes amb activitat GTPasa com Rho i NF-1, i el fosfatidil inositol quinasa.^{241,346} Altres quinases destacades en el procés carcinogènic estan localitzades intranuclearment i constitueixen l'últim esglaó de les cascades metabòliques, la majoria d'aquestes quinases són dependents de ciclins i activen factors de transcripció que regulen l'expressió de gens que controlen la proliferació cel·lular.¹⁵⁶ D'altra banda, la glicogen sintasa quinasa 3 junt amb la proteïna Apc degraden la β -catenina en condicions normals, mentre que la inhibició d'aquest enzim resulta en una acumulació intracel·lular de β -catenina que es relaciona en la progressió maligne de la cèl·lula.¹⁵⁶

Els enzims citoplasmàtics intermediaris de les vies metabòliques relacionades amb el procés carcinogènic poden constituir en el futur atractives dianes terapèutiques. Actualment, no existeixen estudis que centrin els seus objectius en la influència de la dieta, en general, i del greix, en particular, sobre aquesta maquinària enzimàtica, principalment serina/treonina quinases.

5.4.2.4. Ornitina descarboxilasa.

L'ornitina descarboxilasa és l'enzim que catalitza el primer pas en la producció de les poliamines a partir de l'ornitina. Les poliamines són essencials en processos com la proliferació cel·lular, diferenciació i transformació a la mucosa gastrointestinal.^{296,358} L'ornitina descarboxilasa s'activa durant la transformació

cel lular colònica induïda per carcinògens i per oncògens.^{236,371} De fet, la proteïna codificada per *c-myc*, la qual s'associa amb el creixement i la diferenciació cel lular, és un dels protoncògens que activen l'ornitina decarboxilasa.³¹¹ La inducció de l'ornitina decarboxilasa actua com un protoncògen en sistemes on la promoció tumoral evoluciona pas a pas com al colon. En aquest context, la inhibició d'aquest enzim bloqueja la promoció tumoral en models animals de carcinogènesi.^{165,236}

Malgrat que l'ornitina decarboxilasa constitueix un destacable biomarcador de la carcinogènesi colònica, pocs estudis han valorat l'efecte dels lípids sobre la seva activitat. A un estudi es va observar que dietes amb un alt contingut d'oli de blat de moro incrementaven l'activitat de l'ornitina decarboxilasa respecte a dietes amb un baix contingut d'aquest greix i dietes amb un alt contingut amb oli de peix o d'oliva tenien un efecte similar a l'obtingut per la dieta baixa amb oli de blat de moro.³⁹⁴

D'altra banda, l'administració intrarectal d'isòmers no oxidats *cis* o *trans* d'àcid linoleic i AA no mostra cap efecte sobre l'activitat de l'ornitina decarboxilasa, mentre que els hidroxil o hidroperoxil derivats indueixen un augment en l'activitat d'aquest enzim.⁷² Aquests resultats són consistents amb observacions on l'augment de productes lipoxigenàsics es correlaciona positivament amb l'activitat de l'ornitina decarboxilasa i amb la proliferació colònica en rates estimulades amb diferents àcids biliars.¹³⁵

En definitiva, aquests estudis suggereixen que els AG insaturats de la sèrie n6 incrementen l'activitat de l'ornitina decarboxilasa probablement a través tant dels productes del seu metabolisme oxidatiu.

5.4.2.5. Cicle Inositol fosfat.

L'expressió i l'activitat de la PLC- així com els nivells de DAG colònics s'han mostrat alterats durant el procés carcinogènic colorectal tant en animals com en

humans. Concretament, la transformació oncogènica al colon s'ha associat amb un augment en el contingut intracel·lular de DAG, el que es correspon amb la sobreexpressió i hiperactivació de la PLC- β .^{224,335,339,395} Aquests esdeveniments es relacionen amb una alteració en la regulació de l'activitat i expressió de la PKC i, conseqüentment, amb una alteració de la citocinètica. Paradoxalment, altres estudis han evidenciat una disminució significativa en el contingut de DAG als tumors colònics respecte a la mucosa sana adjacent.⁴³³

Tant la PLC- β com el DAG són els elements del cicle de l'inositol fosfat més susceptibles de ser modificats pel tipus i la quantitat de greix dietètic. Estudis en animals alimentats amb dietes amb oli de peix, contràriament als alimentats amb oli de blat de moro, mostren una reducció significativa de l'expressió de PLC- β i dels nivells de DAG a la mucosa colònica 15 setmanes després d'haver-les-hi injectat l'AOM (**taula 5.1**).²²⁴ A més, una quantitat elevada d'oli de peix a la dieta (20.5%) bloqueja l'activitat de la PLC- β als tumors de rates induïdes amb carcinogen en comparació a les rates que han estat alimentades amb oli de blat de moro (tant al 5% com al 23%) (**taula 5.1**).³⁹⁵ Aquests estudis mostren que l'efecte protector de l'oli de peix sobre el desenvolupament oncogènic possiblement tingui relació amb accions, des dels primers estadis oncogènics, sobre els mecanismes de transducció de senyals. D'altra banda, malgrat l'existència d'estudis amb cultius de cèl·lules tumorals on apareixen correlacions positives entre el grau d'insaturació de les membranes plasmàtiques i els nivells intracel·lulars d'IP₃ o correlacions negatives entre l'activitat de la PLC i l'àcid dihomò- γ -linoleic,^{17,18} no es coneix amb precisió la regulació del cicle de l'inositol-fosfat per part dels diferents AG.

Taula 5.1.: Nivells intracel·lulars de DAG i expressió de la PLC- α a la mucosa colònica 15 setmanes després d'haver administrat AOM (a).²²⁴ Activitat de la PLC- α en tumors de rates tractades amb AOM (b).³⁹⁵

Greix dietètic/Carcinogen	Nivells de DAG ^a (nmol DAG/100nmol total fosfolípids)	Expressió de PLC- α (DO \times mm ²)	Activitat de la PLC- α (pmol [³ H]IP ₃ /mg proteïna/15min. A 37°C)
Oli de blat de moro/AOM	0.522 \pm 0.049*	0.178 \pm 0.010*	135 \pm 9.5*
Oli de blat de moro/Salí	0.253 \pm 0.054	0.115 \pm 0.012	-
Oli de peix/AOM	0.199 \pm 0.035	0.121 \pm 0.008	84 \pm 12
Oli de peix/Salí	0.237 \pm 0.035	0.112 \pm 0.007	-

^a La dieta amb oli de peix conté 11.5g d'oli de peix i 3.5g d'oli de blat de moro per cada 100g de dieta. La dieta amb oli de blat de moro conté 15g d'aquest per cada 100g de dieta.

^b Cada 100g de la dieta d'oli de peix conté 20.5g d'oli de peix i 3g d'oli de blat de moro. 100g de la dieta de blat de moro conté 23.5g d'aquest oli.

* Significativament diferent ($p < 0.05$) respecte als altres grups.

Els AG de la dieta poden exercir les seves accions sobre el DAG i la PLC- α de forma extra o intracel·lular. Les modificacions del cicle de l'inositol fosfat de forma extracel·lular es basen en observacions experimentals en animals tractats amb AOM on dietes amb un alt contingut d'AGPI de la sèrie n6 (23%), al revés dels AGPI de la sèrie n3, influeixen el metabolisme bacterià augmentant la producció d'àcids biliars secundaris i DAG intraluminal.^{395,403} Això produeix una activació de la PLC- α i una elevació dels nivells intracel·lulars de DAG. D'altra banda, també s'ha suggerit l'existència d'interaccions entre greix i fibra que pot ocasionar alteracions del metabolisme bacterià, concretament, s'ha observat que la combinació oli de peix i cel·lulosa produeix espècies de DAG amb menor capacitat d'activar la PKC.³⁶⁹

5.4.3. AA i els eicosanoides.

Diversos estudis han suggerit que els efectes dels AGPI n6 poden ser mediatos per la síntesi i el metabolisme dels eicosanoides. Tal i com s'ha esmentat al darrer capítol la participació del metabolisme oxidatiu de l'AA a la carcinogènesi colorectal queda palès per l'existència d'estudis on l'activitat i l'expressió d'enzims

relacionats amb la generació d'eicosanoides està augmentada.^{145,187,257,395,431} Tanmateix, existeix una generació elevada de prostanoides provinents de l'AA als tumors respecte a la mucosa colònica normal.^{187,383,442} De fet, aquests estudis suggereixen una correlació positiva entre l'expressió de la COX-2 i la producció de PGE₂ a les lesions tumorals.^{187,383,395,442} Addicionalment, l'augment del metabolisme ciclooxigenàtic sembla ésser un fenomen posterior a les primeres alteracions genètiques que acompanyen la carcinogènesi colorectal.^{344,349,376,383,444,503,504} D'altra banda, l'ús d'inhibidors de les ciclooxigenases s'ha associat amb un descens de l'oncogènia intestinal tant en humans com en models animals de carcinogènesi experimental.^{25,111,180,349,413,442,500} En aquest sentit, malgrat no haver gaires evidències que relacionin directament els eicosanoides amb la formació de FCA, l'administració d'DHA o d'inhibidors de les ciclooxigenases a animals tractats amb carcinogens comporta un descens significatiu d'aquestes formacions preneoplàsiques.^{111,402,486}

Estudis en humans han observat un augment progressiu en el contingut d'AA a la mucosa a mesura que evoluciona la seqüència adenoma-carcinoma en detriment de l'EPA.¹⁵⁷ L'augment en els nivells d'AA als tumors també han estat evidenciat en animals d'experimentació.³³⁴ D'altra banda, l'administració d'oli de peix, en forma de greix dietètic o com a suplement, provoca un descens en el contingut d'AA en plasma i a la mucosa colònica tant en rates sanes com induïdes amb AOM.^{197,417,485} Aquestes evidències suggereixen que la biodisponibilitat de l'AA constitueix un element important en el desenvolupament neoplàsic i minvar el contingut d'AA per manipulació dietètica pot comportar efectes beneficiosos.

L'AA és el precursor dels prostanoides de la sèrie 2 (TXB₂, PGI₂,..) i productes del metabolisme lipoxigenàtic de la sèrie 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄,...). Una de les hipòtesis en què es basa l'ús dietètic de diferents famílies de d'AG és la producció de metabolits ciclooxigenàsics i lipoxigenàsics amb menys activitat biològica. En aquest sentit, l'àcid dihomolínoleic com a substrat proporciona PGE₁ i TXB₁, mentre que l'EPA forma PGE₃, TXB₃ i LTB₅.^{67,395} D'altra banda, l'àcid eicosatrienoic (C20:3n9), producte final de la dessaturació/elongació de l'àcid oleic, produeix

LTB₃.²¹⁹ En conseqüència, és plausible pensar que una optimització dietètica del quocient APCI_{n3}/AGPI_{n6} pot comportar un equilibri en la producció d'eicosanoides amb efectes beneficiosos en diferents estats patològics. De fet, l'administració d'oli de peix (AGPI n3) s'associa, d'una banda, a una reducció de la producció de PGE₂ i LTB₄,^{392,395,417,485} i, d'altra banda, a un augment en la síntesi de PGE₃ i LTB₅.^{417,475} Efectes similars AGPI de la sèrie n3 sobre la producció de PGE₂ ha estat observat al teixit mamari de rates sanes.²¹

L'efecte del tipus de greix dietètic sobre la producció de metabòlits lipoxigenàsics a la carcinogènesi colònica ha estat relativament poc estudiat. Destaquen estudis recents on es suggereix que metabòlits oxidats de l'àcid linoleic per l'acció de la 15-LOX poden jugar un destacat paper en la proliferació i diferenciació cel·lular.^{215,247}

Paral·lelament a la producció d'eicosanoides no derivats de l'AA, la incorporació a les membranes cel·lulars d'AGPI n3 o n9 pot produir una regulació addicional de les ciclooxigenases i lipoxigenases (**figura 5.2**). En aquest sentit estudis amb cultius de limfòcits i macròfags suggereixen una inhibició competitiva de l'EPA sobre l'AA degut a la reduïda capacitat de ser metabolitzat per les ciclooxigenases.^{71,324} Altres estudis evidencien un millor rendiment de l'EPA que de l'AA per ser metabolitzat via LOX, no obstant la LTA hidrolasa té molta menys afinitat pel LTA₅ que pel LTA₄.³⁷⁷ Pel que fa a l'DHA, tot i constituir una possible reserva d'EPA per un procés de retroconversió, l'administració d'aquest AG de 22 carbons a cultius de cèl·lules immunocompetents mostra una elevadíssima capacitat d'inhibició de la COX i alteració de la síntesi de LTB₄.^{66,71,245} D'altra banda, mentre el metabolisme ciclooxigenàtic de l'àcid dihomolínoleic forma PGE₁, aquest no constitueix un substrat de la 5-LOX però sí de la 15-LOX.^{323,466}

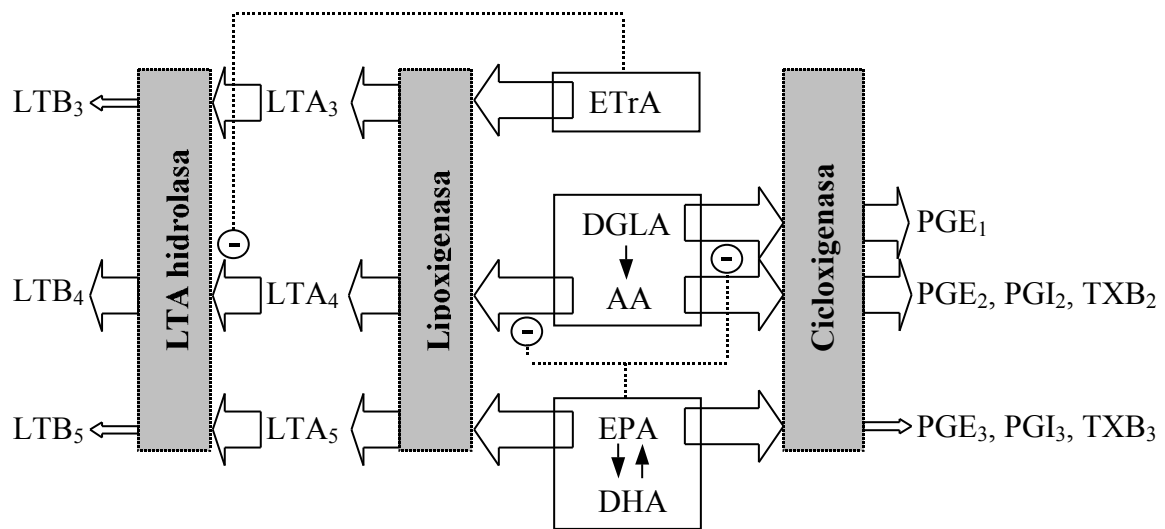


Fig. 5.1.: Representació de la influència de les diferents famílies d'AGPI sobre la producció i metabolisme dels eicosanoides. ETrA, àcid eicosatrienoic (C20:3n9); DGLA, àcid dihomolínoleic (C20:3n6); AA, àcid araquidònic (C20:4n6); EPA, àcid eicosatrienoic (C20:5n3); DHA, àcid docosahexaenoic (C22:6n3); PG, prostaglandina; TX, tromboxà; LT, leucotriè. Les fletxes més gruixudes representen un flux metabòlic normal, mentre que les més primes representen un metabolisme restringit. Les línies discontinuades senyalen l'alteració en el metabolisme d'un eicosanoid per part d'un AGPI.

Estudis on s'avaluen les interaccions metabòliques entre les diferents famílies d'AG posen de relleu altres nivells de regulació en la producció de l'AA. Així podem observar alteracions a la producció endògena d'AA com a resultat de la competició entre l'àcid linoleic, àcid γ -linolènic i l'àcid oleic per la Δ^6 -deshidrogenasa.^{58,59} Addicionalment i tal com s'ha esmentat en capítols anteriors, l'activitat de la desaturasa pot ser inhibida per productes com l'EPA i DHA que a la vegada són els AG predominants en l'oli de peix. La regulació dels processos de desaturació i elongació de forma exògena o endògena pot proporcionar un augment d'EPA i àcid dihomolínoleic i una disminució d'AA. Un altre nivell de regulació del metabolisme de l'AA el pot constituir la incorporació preferencial d'un tipus d'AG a una espècie fosfolípida concreta,^{18,85,489} consegüentment això pot influir en l'alliberament de l'AA per les fosfolipases que actuen preferentment sobre el fosfatidilinositol i la fosfatidilcolina.

Així mateix, el tipus de greix de la dieta pot influenciar l'activitat d'enzims com la PLA₂ i la PLC necessaris per l'alliberament de l'AA de la membrana cel·lular. De

fet dietes amb un elevat contingut d'oli de peix inhibeixen aquests enzims en comparació amb dietes amb un alt contingut d'oli de blat de moro.³⁹⁵

En definitiva, les evidències sobre la participació dels eicosanoides en el procés carcinogènic colorectal fan raonable pensar que aquests puguin constituir una diana terapèutica. Esbrinar la influència de les diferents famílies d'AGPI sobre el complex metabolisme de l'AA ens pot ajudar a reconèixer els mecanismes beneficiosos associats a olis com el de peix i el d'oliva.

5.4.4. Apoptosi.

La mort cel lular pot ser de dos tipus: necrosi i apoptosi. Mentre que la necrosi és activada en diferents situacions patològiques, l'apoptosi consisteix en una autodestrucció controlada genèticament i que pot ser activada tant fisiològicament com patològicament.^{357,366,386} La participació en processos com la morfogènesi en el desenvolupament animal i l'homeostasi tissular en individus adults, fa de l'apoptosi un important mecanisme en el desenvolupament normal cel lular oposat a la mitosi. Així, en un teixit com el budell on existeix una renovació constant del nombre de cèl lules epitelials, l'apoptosi es converteix en un regulador de la proliferació cel lular i de la susceptibilitat dels colonòcits a la transformació neoplàsica. En aquest sentit, el quocient proliferació/apoptosi pot ser un indicador del grau de malignitat de la neoplàsia colorectal.⁵⁰⁵

L'apoptosi ha estat un paràmetre important en l'avaluació quimioprotectora de diverses substàncies a la carcinogènesi experimental.^{235,398,428,543} La carcinogènesi induïda químicament provoca un estat agut caracteritzat per un augment en la taxa de cèl lules apoptòtiques i una disminució de la proliferació a la mucosa intestinal dels animals, tal i com s'ha descrit al capítol 1.²⁶⁶ Seguidament, hi ha una fase compensatòria on es normalitza relativament aquesta situació entre el quart i cinquè dia després de la inducció: disminució de l'apoptosi i augment de la proliferació cel lular. Addicionalment, l'acció mutagènica del carcinogen

acompanya aquest procés de manera que les possibles alteracions genètiques que apareguin es fan persistents entre les cèl·lules que escapen a l'apoptosi i les que hiperprolifereu.¹³⁷

De la mateixa manera que constituents de la dieta poden modificar el complex procés apoptòtic a la carcinogènesi experimental,^{109,364,543} és plausible pensar que les diferents famílies d'AG també ho puguin fer. Addicionalment, tal i com és reflexa en el capítol anterior, models experimentals *in vivo* i *in vitro* de càncer han relacionat el metabolisme de l'AA amb la capacitat de regular el procés apoptòtic al budell. Malgrat això, pocs estudis han avaluat l'efecte dels greixos dietètics sobre l'apoptosi a la carcinogènesi experimental.

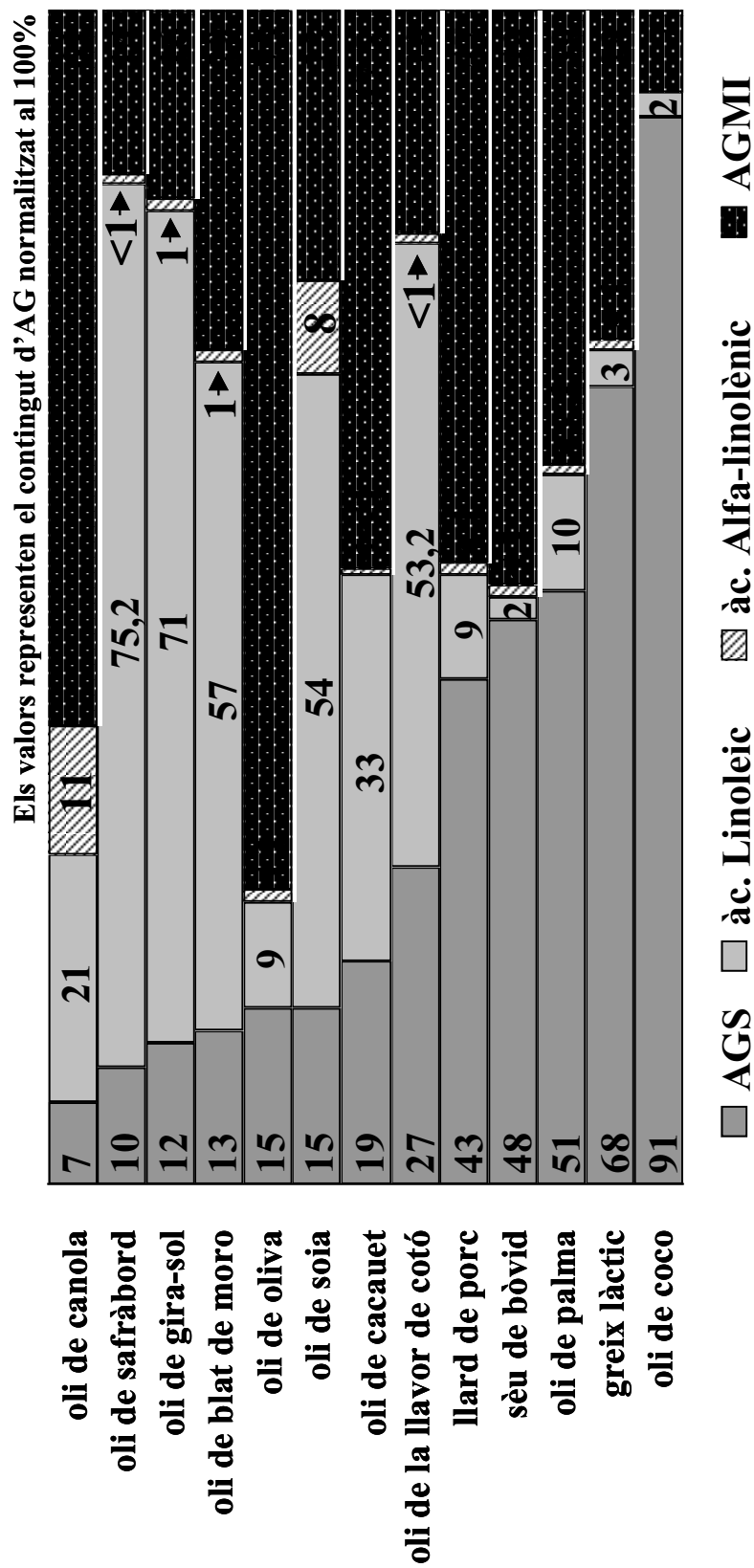
Recentment, s'ha demostrat que l'administració dietètica d'oli de peix en rates tractades amb AOM augmenta l'apoptosi de les cèl·lules de la mucosa colònica, tant a les poques hores de la inducció com en estadis més avançats, en comparació a l'oli de blat de moro i a mesclures de greixos rics amb AGS.^{94,95,266} La suplementació de dosis baixes de EPA i DHA també eleva la taxa apoptòtica a les criptes de rates sanes.⁸⁵ Aquest mateix efecte de l'oli de peix sobre l'apoptosi ha estat identificat a les cèl·lules tumorals de rates tractades amb AOM.³⁹² Aquest augment de l'apoptosi s'associa amb una menor formació de FCA i de tumors en els animals.

Altres estudis observen que l'apoptosi es correlaciona negativament amb l'expressió de la PKC- II en animals transgènics que desenvolupen càncer colorectal i l'oli de peix, al contrari que l'oli de blat de moro, bloqueja l'expressió d'aquesta isoforma de PKC.¹²¹

En definitiva, sembla que els greixos de la dieta poden alterar l'apoptosi als colonòcits normals o neoplàsics. El mecanisme pel que exerceixen aquest efecte és desconegut. No obstant això, s'ha observat que tant la PGE₂ i el LTB₄ poden augmentar l'expressió del gen *Bcl-2*,^{344,444} el que s'associa a una disminució de

l'apoptosi. Així doncs, la possible influència dels greixos dietètics sobre l'apoptosi és un mecanisme que s'afegeix als esmentats anteriorment (metabolisme de l'AA, transmissió de senyals intracel·lulars i expressió gènica) amb capacitat de modular el procés oncogènic colorectal, ja sigui de forma individual o per la interacció entre ells.^{94,392}

Figura 5.1.: Comparació del contingut d'AG entre els diferents greixos dietètics més corrents en l'alimentació humana. Informació obtinguda del Canola Council of Canada, Manitoba, Canada.



Part experimental

CAPÍTOL 6. HIPÒTESI I OBJECTIUS

6.1. HIPÒTESI.

Als darrers temps el contingut greixós de la dieta ha rebut una considerable atenció com a possible factor de risc a la etiologia cancerígena colònica. Estudis epidemiològics han associat el contingut de greix de la dieta amb la incidència del càncer colorectal.^{79,474,528,531} Estudis amb animals d'experimentació també han descrit l'efecte promotor tumoral de dietes amb un elevat contingut de greix (20%) respecte a les d'un contingut més baix (5%).^{73,203,261,407,519} Estudis similars han mostrat que l'efecte afavoridor de l'oncogènia colorectal no fou exclusivament associat a la quantitat de greix, sinó que la composició d'aquests és un element a tenir en compte. Així, s'ha demostrat com una dieta amb un contingut elevat d'AG de la sèrie n6 (23,5%), que provenen de l'oli de blat de moro, té efectes procarcinogènics, especialment a la fase d'iniciació o de promoció,^{399,401} mentre que una dieta amb la mateixa quantitat de greix que l'anterior (23,5%) però que en aquest cas prové de l'oli de peix, ric en AG de la sèrie n3, disminueix la incidència tumoral al colon tant a la fase d'iniciació com a la de postiniciació.³⁹⁹ Pel que fa a l'oli d'oliva, l'efecte d'aquest sobre la carcinogènesi colorectal ha estat escassament estudiat. En aquest sentit, cal destacar un estudi on l'ús d'una dieta amb una elevada quantitat de greix que prové de l'oli d'oliva (23,5%) comporta una reducció de la promoció tumoral.⁴⁰⁰

La majoria d'aquests estudis que avaluen l'efecte del greix dietètic sobre la promoció tumoral a l'animal d'experimentació ho fan en dietes que contenen un 20% de greix, el que aporta més del 30% de calories de la dieta. Aquest aport de greix seria equivalent a la ingesta i aport energètic pel greix als humans de països occidentals. En canvi, el contingut normal de greix d'una dieta de manteniment per rates s'ha xifrat entre el 4 i el 5% del total dels elements que la integren, en aquest cas, l'aportació calòrica per part dels lípids suposa el 12%.⁴⁰⁹ Per tant, la

necessitat en macronutrients i distribució de l'energia és diferent entre la dieta humana i la de les rates. La ingesta energètica diària de les rates és de 1672 kJ/kg de pes corporal, mentre que pels humans la necessitat energètica diària oscil·la entre 125 i 146 kJ/kg. Malgrat que les dietes amb un alt contingut de greix han estat àmpliament utilitzades als models animals de carcinogènesi colorectal, l'ús de dietes amb un nivell de greix al voltant del 5% comporta la valoració de l'efecte dels greixos dietètics en condicions properes a la normalitat. De fet, tot i que els nivells normolipídics de les dietes experimentals suposen una aproximació raonable a l'estudi de la carcinogènesi, no existeix molta informació sobre l'administració de dietes amb un 5% de greix que provenguin de diferents fonts. En relació a això, s'ha observat que dietes amb un contingut de greix del 5% en forma, principalment, d'EPA (AGPI n3) o àcid esteàric (AG saturat) té efectes anticarcinogènics al còlon en comparació amb una dieta amb els mateixos nivells de greix però amb l'àcid linoleic (AGPI n6) com a principal component lipídic.^{312,426}

El possible efecte preventiu d'un contingut dietètic normolipídic (5%) d'oli d'oliva sobre la carcinogènesi colònica en rates ha estat insuficientment estudiat. Això pot ser de gran interès, ja que l'àcid oleic, principal AG de l'oli d'oliva, és, a la vegada, el principal component lipídic de la dieta Mediterrània. En aquest sentit, estudis epidemiològics han associat l'oli d'oliva amb una sèrie de característiques protectores sobre l'estrès oxidatiu i la carcinogènesi.^{13,159,256,440,527,534} D'altra banda, un recent estudi realitzat a França suggereix que una ingesta baixa d'àcid oleic pot incrementar el risc de patir una neoplàsia al còlon esquerra.⁵⁵ Així mateix, un altre treball recent associa una elevada ingesta d'AGMI, principalment derivats de l'oli d'oliva, a un descens significatiu en el risc de càncer colorectal de genotipus salvatge *Ki-ras*.³¹

6.2. OBJECTIUS

Davant totes aquestes dades, els objectius d'aquesta tesi són:

1. Avaluar l'efecte d'una dieta amb un 5% d'oli d'oliva, en comparació a dues dietes isolipídiques a base d'oli de peix i oli de cèrtam, a les fases d'iniciació i promoció tumoral en un model de carcinogènesi induïda amb AOM en rates.
2. Estudiar els canvis del perfil d'AG a la mucosa colònica en funció del contingut lipídic de la dieta i del procés carcinogènic al còlon.
3. Avaluar la producció intracolònica d'eicosanoides en les fases inicials de la carcinogènesi colònica i l'efecte de dietes amb un diferent contingut lipídic.

CAPÍTOL 7. MATERIAL I MÈTODES

7.1. ANIMALS I ESTABULACIÓ

S'utilitzaren rates de la soca Sprague-Dawley mascles subministrades per B&K Universal (Barcelona). Els animals estaven controlats i arribaren amb un informe veterinari on se certificava que els animals estaven lliures de qualsevol paràsit o microorganisme patogen. Els animals s'inclogueren a l'estudi amb quatre setmanes de vida, amb un pes aproximat d'entre 95 i 110 g.

Es distribuïren dos animals per cada gàbia de metacrilat amb una reixa basal per tal d'evitar la coprofàgia i la ingesta dels encenalls. Aquest material d'estabulació va ser subministrat per Panlab S.L. (Barcelona). Els animals es mantingueren en una cambra amb un cicle de llum/fosc de 18/6 hores, al 50% d'humitat i a una temperatura constant de 21°C.

La dieta va ser administrada mitjançant menjadors d'acer inoxidable especialment adaptats per a dietes en pols (Letica, Barcelona). Aquests menjadors permetien l'accés lliure a la dieta amb una mínima pèrdua de l'aliment per l'acció dels animals, i tenien una capacitat per contenir 200 g de dieta en pols. A més, els animals tenien accés "ad libitum" a l'aigua de beguda.

La manipulació dels animals i la seva estabulació van estar subjectes a l'acceptació del Comitè Ètic de l'Hospital Universitari "Germans Trias i Pujol" i del Departament de Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

7.2. DIÈTES

Les dietes experimentals foren preparades per la companyia Scientific Hospital Supplies (SHS) International Limited (Liverpool, Anglaterra). La composició

qualitativa i quantitativa d'aquestes dietes en pols fou la següent (per 100 g): Proteïnes, 20 g; carbohidrats, 64 g; fibra, 8 g; vitamines, 90 mg; minerals, 2 g i elements traça, 74 mg (la composició vitamínica, mineral i dels elements traça està detallada a l' **annex 1**). A aquesta base s'afegí posteriorment 5 g de greix provinent de 3 fonts diferents, tal i com s'exposa a continuació.

Les tres dietes foren preparades afegint 5 g d'oli de càrtam (dieta n6), 5 g d'oli sintètic Ropufa '30' n3 EPA (dieta n3) o 5 g d'oli d'oliva (dieta n9) a cada 95 g de la dieta bàsica esmentada. L'oli Ropufa '30' n3 EPA provenia de Roche (Basel, Suïsa), mentre que l'oli de càrtam i l'oli d'oliva van ser subministrats per Alembic Products Limited (Chester, Regne Unit). La composició dels AG de la dieta va ser valorada per cromatografia gas-liquid en el moment de l'inici de l'estudi (**annex 2**). El procediment emprat fou similar al que es descriu a l'apartat "anàlisi dels AG de la mucosa colònica".

Per tal controlar qualsevol procés d'oxidació lipídica, la valoració fou repetida en 4 ocasions en el transcurs de l'estudi. Les diferències més importants en la composició lipídica de les tres dietes, com pot observar-se a la **taula 7.1**, són que la dieta n-6 està percentualment enriquida amb àcid linoleic (18:2 n-6), constituint un 59,12% del total d'AG que integren la dieta. La dieta n-3 ho està en els àcids grassos eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) i docosahexaenoic (DHA, 22:6 n-3), (16,91% i 8,08% respectivament) i la dieta n-9 està percentualment enriquida (56,04%) amb àcid oleic (18:1 n-9).

L'aport calòric de les proteïnes, carbohidrats i greix fou 3,2 MJ/kg (19,88%), 11,0 MJ/kg (68,32%) i 1,9 MJ/kg (11,8%), respectivament; el que representà un valor energètic total de 16,1 MJ/kg per les tres dietes. Aquest valor és considerat normocalòric i equilibrat en tots els seus components com a dieta de manteniment per a rates.^{409,410}

Les dietes foren envasades hermèticament en llaunes de 500 g sota atmòsfera de

nitrogen i emmagatzemades en cambres refrigerades. Les dietes eren de color blanc amb textura de pols molt fi semblant a la farina i un tacte greixós.

Una vegada posada la dieta en els menjadors especials, aquesta es canviava tres cops per setmana, a fi i efecte d'evitar la degradació dels diferents components de la dieta, i especialment per evitar l'oxidació dels diferents AG, tenint en compte l'elevada susceptibilitat d'alguns d'aquests, sobretot de la dieta n3, a oxidar-se.

Taula 7.1.: composició lipídica de la dieta en forma percentual

AG (%)	Dieta n-6	Dieta n-3	Dieta n-9
	Oli de càrtam	Oli de peix	Oli d'oliva
14:0	0.72	6.68	1.05
16:0	9.85	19.85	19.09
16:1n7	0.18	7.70	0.79
18:0	5.23	4.26	7.63
18:1n9	19.28	13.41	56.04
18:1n7	ND	3.01	0.49
18:2n6	59.12	12.11	8.46
18:3n6	0.33	0.26	0.88
18:3n3	0.50	1.02	0.60
20:4n6	1.09	1.14	ND
20:5n3	ND	16.91	ND
24:0	ND	0.87	ND
24:1n9	0.32	0.40	0.96
22:5n6	ND	0.28	ND
22:5n3	ND	1.70	ND
22:6n3	ND	8.08	ND

ND: nivells no detectables

7.

3.DISSENY EXPERIMENTAL

Es van incloure un total de 108 rates en l'estudi, que foren aleatoritzades en tres grups dietètics de 36 animals cadascun: n6, n3 i n9. Tots els animals reberen una

dieta en pols normocalòrica i normolipídica amb la mateixa composició dels seus elements, excepte la font de greix. Tal i com hem esmentat, l'aport calòric del greix dietètic fou aproximadament el 12% del total de la dieta.

La meitat dels animals de cada grup dietètic actuaren de controls (18 animals) i l'altra meitat (18 animals) foren tractats amb el carcinogen (**figura 7.1**).

Després d'una setmana d'adaptació a les dietes es va començar a administrar l'AOM dissolt en salí, a una concentració de 7,4 mg/kg de pes de l'animal, per via subcutània, un cop a la setmana durant onze setmanes. Els animals que actuaren de controls reberen el mateix volum de salí en les mateixes condicions.

A la setmana 12, és a dir, una setmana després de l'última dosi de carcinogen o de salí, se sacrificaren 6 animals tractats amb carcinogen i sis animals controls de cada grup dietètic. S'extragué el còlon per estudiar la inducció de FCA i la incorporació dels AG de la dieta a la mucosa colònica.

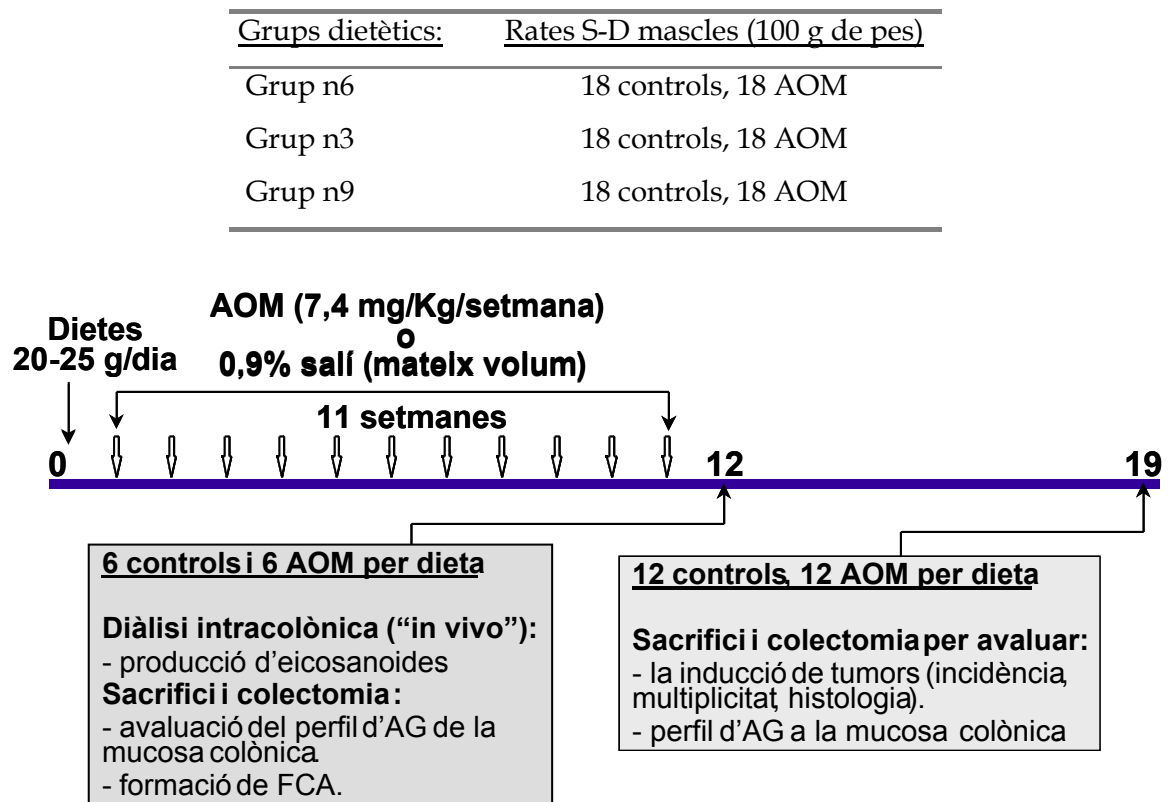
La resta dels animals se sacrificaren 19 setmanes després de la primera dosi del tractament amb AOM o salí. S'estudià el perfil d'AG a la mucosa i l'aparició de tumors.

D'altra banda, es va practicar una diàlisi intracolònica *in vivo* per estudiar la producció local d'eicosanoides el dia abans dels sacrificis a la setmana 12.

Durant tot l'estudi es va fer un seguiment de la ingesta i del pes dos cops per setmana a tots els animals.

Tots aquests aspectes metodològics es comenten extensament als següents apartats.

Figura 7.1.: Disseny experimental.



7.4. INDUCCIÓ DE LA CARCINOGENÈSI

La carcinogènesi s'induí seguint el protocol descrit per Minoura.³¹² El carcinogen que es va utilitzar fou l'AOM (Sigma Chemical, Saint Louis, MO) que es subministrà en forma pura i s'emmagatzemà a -20°C . Com s'ha descrit en el primer capítol, aquesta substància és un metabòlit de l'1,2-dimetilhidracina amb un elevat rendiment com a carcinogen exclusivament colònic.¹⁶⁰

La dosi a injectar era de 7,4 mg/kg de pes de l'animal una vegada a la setmana per via subcutània, durant onze setmanes. La injecció es realitzava a la zona posterior de la cintura pelviana de l'animal mitjançant una xeringa d'1 ml amb l'agulla incorporada. La densitat de l'AOM és de 0,94 a 41°C i és soluble en aigua. La dosi del carcinogen es diluïa en solució salina fisiològica de manera que el volum a injectar a cada rata estès entre 0,1 i 0,2 ml segons el pes de l'animal.

Altres estudis han utilitzat dosis més altes d'AOM fins a 20 mg/kg de pes de l'animal. En aquest estudi es va escollir la dosi de 7,4 mg/kg seguint el protocol emprat per Minoura T *et al.*,³¹² en el qual s'estudià l'efecte de dietes amb un 5% de greix en comparació amb altres estudis que administraven dietes amb un contingut igual o superior al 20% de lípids.

7.5. ESTUDI METABÒLIC

Es portà un control de la ingesta i de la variació de pes de tots els animals durant el transcurs de l'estudi. Dos cops per setmana es pesaven els animals, així com la dieta consumida mitjançant una balança amb precisió de la dècima de gram (Cobos Precisión, Panlab, Barcelona). Al haver-hi dos animals per gàbia, es va considerar que el consum de dieta individual fos la meitat de cada pesada.

A més, 12 animals (2 controls i 2 tractats amb el carcinogen, de cada grup dietètic) dels que se sacrificaren durant la setmana 19 de l'estudi, foren sotmesos a un control metabòlic diari durant la setmana 15 de l'estudi. Es varen posar els animals, cada un per separat, en una gàbia metabòlica d'acer inoxidable (Panlab, Barcelona). Es deixaren 4 dies per adaptar-se a la nova situació. Seguidament, durant 7 dies més se'ls controlà diàriament la ingesta de menjar, d'aigua i l'evolució del pes corporal amb més precisió degut a les característiques de les gàbies.

7.6. SACRIFICI I COLECTOMIA

La colectomia dels animals s'efectuà sempre *in vivo* amb els animals anestesiats amb una dosi de 2,5 ml/kg de pes de l'animal per via intraperitoneal d'una solució que contenia 23 mg/ml de ketolar, 2 mg/ml de diazepam i 0,2 mg/ml d'atropina.

Mitjançant una laparotomia mitja, s'extreia el còlon des del marge anal fins al cec amb ajut d'unes estisores quirúrgiques separant amb molta cura el duodè i el còlon transvers. Ràpidament s'obria longitudinalment, es rentava amb tampó fosfat fred (4°C) i es dipositava en una safata amb un doble fons que contenia gel per fotografiar-lo i posteriorment processar-lo.

7.7. ESTUDI DELS FCA

Per estudiar la inducció de FCA s'obtingueren 3 seccions seriades de 0,5 cm² de còlon esquerre: dues d'elles de la part distal (a 2 i 4 cm del marge anal) i l'altra de la part proximal (a 8 cm del marge anal). Aquestes tres seccions es dipositaren amb molta cura sobre paper de filtre plegat de manera que quedessin ben orientades horitzontalment i no apareguessin ni plecs ni rulls a la mucosa. D'aquesta manera es fixaren amb formol al 4% amb tampó fosfat (pH=7,2) durant 24 hores.

Seguint el protocol proposat per Bird RP,⁴³ les seccions de còlon fixades, es tenyiren amb blau de metilè al 0,2% amb solució salina durant 5 minuts. Posteriorment, es rentaren amb salí per eliminar l'excés de colorant. Les seccions es dipositaren en portaobjectes amb la mucosa cap amunt i s'observaren per microscòpia òptica (Olympus CHS; Técnicas médicas MAB, S.A.; Barcelona) a 40 augments.

El criteri utilitzat per definir una CA (el que també pot considerar-se com un FCA constituït per una sola CA) va ser el següent: La mida de la cripta havia de

ser al menys dues vegades la mida de les criptes normals que l'envoltessin; l'obertura luminal seria més el líptica que circular; i el revestiment epitelial més gruixut amb una intensa coloració blava que el de les criptes normals del voltant.

El criteri per definir els FCA, formats per més d'una cripta, va ser el següent: a) les criptes individuals que formen part d'un FCA tenen les mateixes característiques que les CA úniques descrites anteriorment; b) les criptes tenen la l'aparença de formar un focus continu, és a dir, no apareixen criptes normals al mig d'un grup de CA; i c) l'àrea total ocupada per les criptes que componen un FCA és més gran que l'àrea ocupada pel mateix nombre de criptes del voltant morfològicament normals.³⁰¹

Els paràmetres que s'estudiaren per 0,5 cm² foren:

- I. El nombre total de FCA.
- II. El nombre total de criptes aberrants.
- III. La multiplicitat dels FCA, és a dir, el nombre de criptes aberrants per focus. D'aquesta manera es va classificar els FCA en sis categories: FCA d'1 a 5 CA per focus i amb >5 CA per focus.

7.8. ESTUDI DELS TUMORS

Els tumors macroscòpics (>1mm de diàmetre) foren extrets dels còlons i fixats amb formol al 4% de tampó fosfat. Foren mantinguts a 4°C durant 24h i, a continuació, inclosos en parafina de forma individual i degudament codificats. Posteriorment, s'obtingueren 2 talls de 5 µm de cada tumor i foren col·locats amb portaobjectes tractats prèviament amb 3-aminopropil trietoxisilan (Sigma Chemical, Saint Louis, MO). Després de ser desparafinats i hidratats (per incubació seriada amb xilol, xilol:etanol (1:1), etanol, etanol:aigua destil·lada (1:1) i aigua destil·lada), les mostres foren tenyides amb hematoxilina i eosina (Sigma Chemical, Saint Louis, MO). La posterior anàlisi histològica fou realitzada per dos anatomopatòlegs desconeguts dels grups experimentals als que pertanyien les

mostres.

Els paràmetres macroscòpics pels tumors colònics estudiats van ser:

- I. La incidència de tumors (nombre d'animals que presentaren algun tumor).
- II. La multiplicitat (nombre de tumors per animal).
- III. El diàmetre de tots els tumors extrets, així com la seva localització dins el còlon. Per això es dividí el còlon en dues àrees: còlon distal (fins a 8 cm del marge anal) i còlon proximal (a partir de 8 cm del marge anal fins al cec).

Així mateix, s'anotà la presència de tumors extraintestinals els quals foren sotmesos al mateix protocol.

Per a l'anàlisi histològica, els tumors es varen distingir entre adenomes i adenocarcinomes. Aquests darrers, addicionalment, es varen classificar segons el grau de diferenciació histològica:

Grau 1= carcinoma ben diferenciat

Grau 2= carcinoma moderadament diferenciat

Grau 3= carcinoma pobrement diferenciat

7.9. ANÀLISI DEL PATRÓ D'ÀCIDS GRASSOS A LA MUCOSA COLÒNICA

Després de recollir les mostres per a l'estudi dels FCA, i de la ressecció dels tumors, es practicà un raspat de la mucosa.

Ràpidament, la mucosa obtinguda es dipositava en criotubs que se submergien en nitrogen líquid per tal d'aturar qualsevol reacció enzimàtica que podés provocar alguna oxidació dels àcids grassos. Posteriorment, s'emmagatzemaren en congelador de -80°C fins al seu processament que mai excedí de dues setmanes posteriors a la recollida.

L'avaluació es realitzà d'acord al procediment utilitzat anteriorment en aquest

mateix laboratori.¹⁵⁷ Les mostres de mucosa van ser vigorosament agitades amb una solució de metanol/benzè (4:1) durant un minut amb un vòrtex (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., N.Y., U.S.A.). Després van ser homogeneïtzades (PRO.200, PRO Scientific Inc., CT, U.S.A.) i sonicades en un bany d'ultrasons (Ultrasons, Selecta, Barcelona). A continuació, s'hi afegí clorur d'acetil a la mescla obtinguda per tal de *trans*-esterificar els AG. La *trans*-esterificació permet optimitzar els temps de retenció i la quantificació dels diferents AG a avaluar. Els solvents orgànics emprats en aquesta etapa foren evaporats sota atmosfera de nitrogen a 40°C, fins la sequedat total. El residu que va quedar va ser redissolt amb 100 µl de benzè, i una alíquota d'1 µl s'injectà al cromatògraf.

Els AG esterificats foren quantificats per cromatografia gas-líquid (Perkin-Elmer Autosystem Chromatograp, Perkin-Elmer, Norwalk, CT), utilitzant una columna capil·lar de 30 m, d'un diàmetre intern de 0,25 mm i amb una fase estacionària SP 2330 (Teknocroma, Barcelona). L'identificació i quantificació dels diferents AG metil-esterificats va fer-se sobre un estàndard extern (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) (**annex 2**). Aquest patró permetria avaluar els AG des de C16:0 al C24:0 a les mostres problema. Els resultats obtinguts foren expressats com a percentatge molar del total d'AG presents a la mostra, menyspreant els pics que representaven menys del 0,5% del total d'AG mesurats.

A més de la quantificació individual dels diferents AG a cada mostra, les diferents famílies d'AG foren agrupades de la següent manera: AG saturats, AGMI, AGPI n3 i AGPI n6; així mateix es calcula el quocient AA/EPA.

7.10. DIÀLISI INTRACOLÒNICA

L'extracció *in vivo* dels eicosanoides del lumen colònic fou realitzada mitjançant una diàlisi intracolònica tal i com es descriu en treballs anteriors del nostre grup.⁴⁰

Dotze hores abans de realitzar la diàlisi, s'introduí un segment de 8 cm d'un tub de cel·lulosa Visking 8/32 (Medicell International, London, UK), que exercí de membrana semipermeable, en tampó fosfat (pH=7,4). Això permetria una total hidratació del tub de diàlisi i, consegüentment, una adient mida de porus.

La bossa de diàlisi es construí a partir d'un tub multiperforat de poliuretà d'1 mm de diàmetre extern i 8 cm de longitud. En l'extrem proximal s'hi adaptà una connexió per xeringa d'un catèter intravenós i a l'extrem distal s'introduí una punta metàlica d'1 cm. Ambdós extrems se segellaren amb Araldit, procurant que a la part distal si formes una bola petita. A continuació, s'introduí aquesta cànula, que actuà de suport, a l'interior del segment de tub Visking hidratat. Es lligaren ambdós extrems amb fil de seda procurant que no sobresortís la membrana de la cànula per evitar qualsevol fricció amb la mucosa colònica i se submergí de nou a la solució de tampó fosfat fins el moment d'utilitzar-la.

Les rates foren anestesiades amb l'administració intraperitoneal d'1,5 ml/Kg d'una solució que contenia 23 mg/ml de ketolar, 2 mg/ml de diazepam i 0,2 mg/ml d'atropina. Aquesta dosi anestèsica permeté recuperar l'animal al cap d'una hora. Les rates es mantingueren en posició decúbit supí sobre una peça de suro adaptat per aquesta funció i que permetia fixar-les per les extremitats. A continuació es comprovà que la bossa de diàlisi no tenia fugues al omplir-la amb el líquid de diàlisi; si estava correcta, es buidà i es diposità de nou en la solució de tampó fosfat. Quan l'animal estava profundament sedat s'introduí amb suavitat la totalitat de la bossa de diàlisi a l'interior del còlon i s'omplí de nou amb 1 ml del líquid de diàlisi. Aquesta solució hipertònica de diàlisi estava composta per un 0,3% d'albumina sèrica bovina en una solució de 120 mmol/l de NaCl i 30 mmol/l de KHCO_3 a pH=7,9. La cànula intracolònica es deixà connectada a la xeringa d'1 ml emprada per introduir-hi la solució hipertònica durant un període d'una hora.

Passada aquesta hora, s'extragué el líquid de diàlisi. El volum de líquid de diàlisi recuperat oscil·lava entre 90% i el 95% del volum inicial. Posteriorment, es

procedí a efectuar tres rentats addicionals de la bossa de diàlisi amb 1 ml d'aigua destil·lada. Aquests rentats foren dipositats en el mateix tub que contenia la solució de diàlisi recuperada i emmagatzemats a -80°C fins la posterior avaluació dels eicosanoides.

Finalment, s'extragué acuradament la cànula de l'interior del còlon i la rata s'allotjà a la seva corresponent gàbia, efectuant un especial vigilància de la recuperació de l'animal.

L'elecció de la durada de la diàlisi (1 hora) fou un compromís entre el temps necessari per arribar a l'equilibri i els efectes irritants de la bossa de diàlisi sobre la producció d'eicosanoides al còlon.^{269,545} A més, els estudis sobre la producció intracolònica d'eicosanoides mitjançant aquest mètode suggereixen que les mesures fetes reflecteixen la producció del teixit adjacent *in vivo*, evitant que apareguin emmascaraments d'altres trams del budell o pel efecte traumàtic que suposa la recol·lecció de biòpsies.^{40,545}

7.11. QUANTIFICACIÓ DELS EICOSANOIDES

7.11.1. Extracció líquid-sòlid dels eicosanoides amb mini columnes C18.

L'extracció de les PGE_2/E_3 i LTB_4/B_5 dels dialitzats colònics fou feta basant-se en els mètodes emprats i validats per Powell WS amb algunes modificacions introduïdes per Ramis I.^{374,388} Aquests mètodes suggereixen uns elevats rendiments en l'extracció conjunta tant de metabòlits lipoxigenàsics com ciclooxigenàsics (superiors al 90%) en condicions àcides amb l'ajut de mini columnes de fase reversa i utilitzant com a solvent el formiat de metil.^{388,389} Així com una alta reproductibilitat amb un coeficient de variació intraassaig que oscil·la entre el 2 i el 5%.

Les mostres, un cop descongelades, foren acidificades a pH 3,15 amb HCl 1N

amb l'ajut d'un pH-metre (MicropH 2000, Crison Instruments S.A.; Barcelona). A continuació, foren centrifugades a 400 \times g a 4°C durant 5 minuts (Medifriger, Selecta; Barcelona). Els següents passos consistiren en practicar una cromatografia líquida de baixa pressió amb mini columnes de fase reversa d'octadacidil sílica (Sep-Pak C₁₈ Plus, Waters Ass.; Massachusetts), el que permeté l'extracció de metabòlits de polaritat intermèdia com fou el cas dels eicosanoides esmentats.

Els Sep-Pak C₁₈ Plus es connectaren al Supelco Visiprep (Teknocroma, Barcelona) que facilita l'extracció de dotze mostres en paral·lel mitjançant un sistema de buit. Aquests cartutxos foren activats passant a través d'ells 10 ml d'etanol i, seguidament, 10 ml d'aigua bidestil·lada a pH=3,15. Aquesta darrera fase es deixà que amares el Sep-Pak C₁₈ Plus. Un cop activats els cartutxos, i de forma gradual, es passaren a través d'ells les mostres i les diferents fases mòbils que extraguieren substàncies no desitjades i recuperar, finalment, els metabòlits d'interès. Aquest procés, de forma detallada, consistí en:

1. Els sobrenadants de les mostres centrifugades foren passats a través dels cartutxos (aproximadament un volum de 3,5 ml per mostra). En aquesta etapa quedaren retingudes a la fase estacionària per interaccions hidrofòbiques diferents substàncies, entre elles les prostaglandines i els leucotriens.
2. Amb el propòsit d'eliminar sals i proteïnes retingudes als cartutxos, es passaren 10 ml d'aigua bidestil·lada a pH=3,15.
3. La següent fase mòbil que fluí a través del Sep-Pak C₁₈ Plus fou 10 ml d'èter de petroli. D'aquesta manera s'eliminà aigua i lípids polars.
4. Per finalitzar, es va passar 5 ml de formiat de metil, el que arrossega els eicosanoides a través del cartutx. A diferència dels passos anteriors, les fraccions obtingudes foren recuperades en tubs de polipropilè degudament codificats.

A continuació, les fraccions foren assecades aprofitant les característiques del formiat de metil (punt d'ebullició de 32°C) amb relativa facilitat. S'emprà un

evaporador-secador (Vacuum-Dryer Appligene, Pacisa; Madrid) que treballà a una pressió negativa de -0,4 bars durant 75 minuts. Qualsevol romanent que quedés en el tub, principalment aigua provinent de les mini columnes, fou eliminada sota atmòsfera de nitrogen a 20°C. El residu sec obtingut es redisolgué en 1 ml d'acetonitril (Sigma Chemical, Saint Louis, MO). D'aquesta manera, les mostres s'emmagatzemaren a -80°C fins que s'efectuà la separació per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) dels diferents eicosanoides, aquest període de temps mai fou superior a un mes.

7.11.2. Separació i purificació de LTB₄/B₅ mitjançant cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC).

Per separar els LTB₄ i LTB₅ s'utilitzà el mètode descrit en anterioritat per Brouard C que permeté una bona resolució dels temps de retenció entre els dos isòmers i la detecció a una longitud d'ona entre 270 i 280 nm.⁷¹ S'emprà un HPLC Isocratic Lc Pump 250 unit a un detector d'U.V. Spectrometric Detector LC 290 de longitud d'ona variable (190-300 nm), ambdós de Perkin-Elmer (Norwalk, CT). Dos-cents µl de les mostres emmagatzemades dissoltes en acetonitril foren assecades totalment sota atmosfera de nitrogen a 25°C i redissoltes en 200 µl de la fase mòbil emprada per la separació cromatogràfica, aquesta consistí en una solució d'H₂O/metanol/acetonitril/àcid acètic (51:9:39:1, v/v) ajustada a pH=5,6 amb trietilamina. Seguidament, injectaren 20 µl de la mostra dissolta en la fase mòbil a una columna de fase reversa Hypersil ODS C₁₈ de 5 µm de porus i de 200x4,6 mm (Teknocroma, Barcelona) unida al HPLC. El flux de la fase mòbil fou isocràtic a 1 ml/minut i la longitud d'ona utilitzada per la detecció fou 270 nm.

Els temps de retenció, establerts amb patrons no radioactius de LTB₄ i LTB₅ (Cayman Chemical Co.; Ann Arbor, U.S.A.) a concentracions d'1, 0,1 i 0,01 µg/ml i en les condicions metodològiques descrites per les mostres problema, foren de 6,9 minuts pel LTB₅ i 10,2 minuts pel LTB₄ (**annex 3**). Aquesta amplia separació dels temps de retenció entre els dos isòmers ens permeté una correcta col·lecció de les

fraccions.

Com a pas preliminar es realitzà la validació de la tècnica mitjançant estàndards no radioactius de LTB₄ i LTB₅ (Cayman Chemical Co.; Ann Arbor, U.S.A.). Considerant que el límit de detecció a 270 nm d'ambdós isòmers en les nostres condicions experimentals fou de 0,01 µg/ml es procedí a practicar un test de correlació amb duplicats de 3 mostres patró de concentracions superiors al límit de detecció (1, 0,1 i 0,01 µg/ml) i amb duplicats de 3 mostres patró per sota del límit de detecció (0,01, 10⁻³, 10⁻⁴ µg/ml) que foren separades per HPLC i quantificades per immunocromatografia, tal i com es detalla més endavant. Addicionalment, es realitzà un test de rendiment per conèixer les possibles pèrdues de LTB₄ i LTB₅ degudes al procediment cromatogràfic amb 4 mostres, per ambdós isòmers, a una concentració inicial de 1 µg/ml que foren injectades, recuperades i tornades a injectar a l'HPLC. Els resultats obtinguts del procés de validació d'aquesta tècnica estan detallats a l'**annex 3**.

Les fraccions corresponents a les mostres problema i als estàndards emprats en el procés de validació que no foren detectats pel detector d'U.V., per ésser d'una concentració inferior a 0,01 µg/ml, es recolliren "a cegues" segons el temps de retenció establert amb un col·lector de fraccions FRAC 100 col·lector (Pharmacia Biotech; Barcelona). Concretament es recolliren fraccions del minut central establert per cada isòmer de LTB i les del minut anterior i posterior. Així es pretenia, per una banda, assegurar-se que no hi havia hagut cap desplaçament del temps de retenció per mostra i, en el cas de mostres molt concentrades, poder recollir les cues dels pics que quedessin fora del minut central. En qualsevol cas, i de forma complementaria, cada 10 mostres que foren passades pel cromatògraf s'afegí de nou un control per corroborar els temps de retenció, i si calia, repetir la separació.

7.11.3. Quantificació per enzim immunoassaig (EIA) de LTB₄ i B₅.

La fase mòbil en què foren recollides les mostres (1 ml) en l'etapa de separació cromatogràfica, així com les fraccions del minut anterior i posterior, foren sotmeses a atmosfera de nitrogen a 25°C fins la sequedat total i s'emmagatzemaren a -80°C. Als dos o tres dies d'haver emmagatzemat la mostra ja es disposava de suficient nombre de mostres per realitzar un immunocromatograma en una placa de 96 pous.

L'EIA es realitzà amb un kit comercial per detectar LTB₄ de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, U.S.A.). Les peculiaritats de la detecció mitjançant aquest EIA es basen en l'ús d'un anticòs anti-LTB₄/B₅ i un anticòs anti-LTB₄/B₅ unit a l'acetilcolinesterasa que amb el substrat adient donà un color groc que absorbeix a una longitud d'ona en un rang de 405 a 420 nm. Així, la intensitat de color fou inversament proporcional a la quantitat de LTB₄ o LTB₅ segons les fraccions avaluades.

Adicionalment, aquest kit comercial aportava dues avantatges substancials alhora de valorar el LTB₄ i el LTB₅. La primera fou el reduït límit de detecció (2,23 pg/ml), aquesta característica complementà la manca de la detecció per espectrofotometria unida al HPLC. D'altra banda, l'especificitat de l'anticòs fou del 100% tant pel LTB₄ com pel LTB₅ (**taula 7.2**), consegüentment, això permetia utilitzar el mateix kit per valorar ambdós isòmers en les mostres que prèviament foren separades per HPLC. En relació amb això, el procediment complet per la quantificació d'eicosanoides fou: extracció (Sep-Pak C₁₈ Plus)+ separació/purificació (HPLC)+ quantificació (EIA).

Taula 7.2.: Especificat de l'anticòs anti-LTB₄ del kit comercial LTB₄ EIA kit (Cayman Chemical Co.; Ann Arbor,MI). Dades aportades pel mateix fabricant:

LTB ₄	100%
LTB ₅	100%
6-trans LTB ₄	39%
6-trans-12-epi-LTB ₄	0,7%
20-hidroxi- LTB ₄	0,5%
5(S)-HETE	0,03%
20-carboxi LTB ₄	<0,01%
5(S), 12(S)-DiHETE	<0,01%
12(S)-HETE	<0,01%
15(S)-HETE	<0,01%
LTC ₄	<0,01%
LTE ₄	<0,01%
LTD ₄	<0,01%
LTF ₄	<0,01%

Les mostres seques provinents de l'etapa de separació/purificació foren redissoltes en 125 µl del tampó aportat pel fabricant del kit i agitades vigorosament durant 5 minuts amb l'ajut d'un vòrtex. Aquesta redissolució comportà una dilució 1:6,25 respecte a la concentració del líquid de diàlisi i permet la quantificació dels LTB a la zona de màxima linearitat de la corba patró (**annex 5**). Es configuraren plaques de 96 pous per valorar el LTB₄ i altres per valorar el LTB₅. Les corbes patró foren formades a partir de estàndards de LTB₄ o LTB₅ (Cayman Chemical Co; Ann Arbor, MI, U.S.A.) segons corresponia per l'isòmer a valorar. En general, la realització de l'EIA s'ajustà a les especificacions del fabricant. La lectura fou realitzada mitjançant un lector de plaques (Anthos Labtec, Salzburg, Austria) a 405 nm.

Cal esmentar que tant les mostres patró com les mostres problema no detectades per l'espectrofotòmetre del HPLC foren quantificades per EIA (**annex 3**).

7.11.4. Separació i purificació de PGE₂ i PGE₃ mitjançant HPLC.

La separació i purificació de la PGE₂ i la PGE₃ fou realitzada per la metodologia descrita per Terragno A.⁴⁹⁵ S'emprà el mateix sistema d'HPLC adaptat a un lector espectrofotomètric que el descrit en la separació i purificació de LTB₄/B₅, a excepció de la columna, que en aquest cas fou una columna de fase reversa Kromasil 100 C₁₈ de 5 µm de porus i d'una mida 150x46 mm (Teknocroma, Barcelona). La fase mòbil fou H₃PO₄/acetonitril (67,2:32,8, v/v) a pH de 2,6, el flux fou isocràtic d'1 ml/minut i la detecció fou feta a una longitud d'ona de 196 nm.

Dos-cents µl de les mostres emmagatzemades dissoltes en acetonitril, procedents de l'etapa d'extracció, foren assecades totalment sota atmosfera de nitrogen a 25°C, es redissolgueren en 200 µl de la fase mòbil i injectaren 20 µl a la columna del HPLC.

En aquestes condicions cromatogràfiques el temps de retenció per la PGE₃ s'establí a 6,12 minuts i per la PGE₂ en 9,36 minuts (**annex 4**). L'ampli interval en el temps de retenció entre ambdós isòmers permeté una bona recuperació/purificació. S'obtingueren dues fraccions, una per obtenir la PGE₂ i una altra per obtenir la PGE₃, de totes les mostres amb l'ajut del col·lector de fraccions FRAC 100 col·lector (Pharmacia Biotech; Barcelona). A la vegada, es recuperaren eluats del minut anterior i del minut posterior, de la mateixa manera que es feia pels LTB₄/B₅. Cada 10 mostres que foren passades a través del cromatògraf s'introduí un patró per controlar si es produí alguna alteració en els temps de retenció; donat el cas, es repetí la separació de les mostres afectades. L'establiment dels temps de retenció esmentats, la validació i la rendibilitat metodològica es realitzà mitjançant patrons no radioactius de PGE₂ i PGE₃

(Cayman Chemical Co.; Ann Arbor, U.S.A.). El límit de detecció a 195 nm per ambdós isòmers prostaglandínics fou 0,025 µg/ml. Es realitzà un test de correlació amb 6 patrons: 3 amb concentracions superiors al límit detecció (0,1, 0,05 i 0,025 µg/ml) i 3 que foren quantificades per EIA un cop separades per HPLC (0,025, $12,5 \times 10^{-3}$ i $6,25 \times 10^{-3}$ µg/ml). D'altra banda, tal i com es descriu pels leucotriens, es realitzà un test de rendibilitat amb un patró d'una concentració 0,1 µg/ml per ambdós isòmers. Els resultats obtinguts en el procés de validació són descrits a l'**annex 4**.

7.11.5. Quantificació per enzim immunoassaig de PGE₂ i E₃.

Per la quantificació dels dos isòmers prostaglandínics s'utilitza un EIA comercialitzat per Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, U.S.A.). Aquest immunoassaig competitiu es basà en el mateix principi que el descrit pel kit de detecció dels LTB₄/B₅. L'anticòs policlonal mostrà una reactivitat creuada (especificitat) del 100% entre la PGE₂ i la PGE₃ (**taula 7.3**). El límit de detecció es xifrà al voltant de 100 pg/ml. Així, novament, el sistema Sep-Pak C₁₈ Plus+ HPLC+EIA aportà un major sensibilitat en la mesura de PGE₂/E₃.

El desenvolupament de la placa de 96 pous s'ajustà a les especificacions del fabricant. Els eluats de les mostres problemes i els patrons destinats al test de correlació (així com les fraccions pertanyents als minuts anteriors i posteriors) foren assecades totalment sota atmosfera de nitrogen a 25°C. A continuació foren redissoltes en 125 µl amb el tampó de l'EIA, el que constituí una dilució 1:6,25 respecte a la concentració del líquid de diàlisi. Es configuraren plaques de 96 pous destinades a l'avaluació de la PGE₂ i altres per la PGE₃ amb les respectives corbes patró a partir d'estàndards no radioactius (Cayman Chemical Co.; Ann Arbor, MI, U.S.A.). Totes les mostres foren valorades per duplicat. La lectura es realitzà a 405 nm amb un lector de plaques (Anthos Labtec, Salzburg, Austria). La dilució emprada permeté fer una lectura de les mostres en el tram lineal de la corba patró (aproximadament en el 80% central de la corba) (**annex 5**).

Taula 7.3.: Especificat de l'anticòs anti-PGE₂ del kit comercial PGE₂ EIA kit (Cayman Chemical Co.; Ann Arbor,MI). Dades aportades pel mateix fabricant:

PGE ₂	100%
PGE ₃	100%
PGE ₁	6,2%
15-ceto PGE ₂	5%
PGF ₂	5%
PGF ₃	0,01%
PGA ₁	<0,01%
PGA ₁	<0,01%
PGB ₁	<0,01%
PGB ₂	<0,01%
PGD ₂	<0,01%
PGF ₁	<0,01%
6-ceto PGF ₁	<0,01%
13,14-dihidro-15-ceto PGF ₂	<0,01%
TXB ₂	<0,01%

7.12. ANÀLISI ESTADÍSTICA.

L'anàlisi estadística va ésser realitzada utilitzant el paquet estadístic SPSS per Windows 6.0 (SPSS Inc; Chicago, Illinois, U.S.A.). Els resultats s'expressaren com a mitjana±error estàndar de la mitjana (ES), o com a percentatjes.

Per la comparació de les variables qualitatives s'utilitzà la prova de la χ^2 i el test exacte de Fisher. Per la comparació de les variables quantitatives paramètriques s'utilitzà l'anàlisi de la variança d'un factor (ANOVA), amb contrastos *a posteriori* mitjançant el test de Bonferroni. D'altra banda, quan no es compliren les condicions d'aplicació de l'ANOVA s'utilitzà test no paramètric de Kruskal-Wallis i el test de la U de Mann-Whitney pels contrastos *a posteriori*. El criteri adoptat de significació estadística fou de $p < 0,05$.

Finalment, per valorar la existència de correlació estadística entre els nivells dels diferents isòmers d'eicosanoides avaluats i els seus respectius precursors (AA o EPA), s'emprà el test de correlació lineal de Pearson per les comparacions paramètriques, i el test d'Spearman per les comparacions no paramètriques. Així mateix, es va avaluar l'ajust a models no lineals dels que es va triar el que presentava la r^2 més elevada.