



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

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

Marisol Cabral Salvadores

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

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

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

4 DISCUSIÓN

El epitelio intestinal es un sistema altamente dinámico que se renueva de forma continua y que está regulado por una serie de moléculas que dan lugar a la activación de vías de señalización intracelular que ajustan la tasa de proliferación celular a la renovación del tejido (Clevers, 2013). La desregulación de los procesos de proliferación y/o apoptosis pueden dar lugar a un estadio precanceroso, que puede evolucionar a CRC. Como sugieren numerosos estudios epidemiológicos y experimentales (ver revisión de Cuendet *et al.*, 2000), los eicosanoides juegan un papel crucial en el CRC. Aunque el papel de algunos de los metabolitos y enzimas de la cascada del AA está bien establecido, todavía se desconoce el efecto de otros y, además, falta una visión conjunta de todos sus componentes que permita comprender su implicación en la regulación de la proliferación de las células epiteliales en el CRC.

Las células Caco-2, es una de las líneas celulares epiteliales intestinales que expresa un mayor número de enzimas de la cascada del AA (Buecher *et al.*, 2005; Cianchi *et al.*, 2006) y por tanto puede sintetizar una gran variedad de eicosanoides. Con un método de HPLC/MS/MS validado previamente por el grupo (Martín-Venegas *et al.*, 2011), se han separado y cuantificado 14 metabolitos del AA representativos de las tres vías (COXs, LOXs y CPY450) junto con el 13-HODE, producido a partir del LA. Aunque varios autores han descrito métodos para analizar eicosanoides de la vía de las COXs (Nithipatikom *et al.*, 2003), de la vía de las COXs y de las LOXs simultáneamente (Unterwurzacher *et al.*, 2008) o eicosanoides sintetizados por la vía de las LOXs y del CPY450 (Miller *et al.*, 2009), el método desarrollado permite analizar simultáneamente, de forma rápida y con una buena sensibilidad, los eicosanoides producidos por las tres vías (Martín-Venegas *et al.*, 2011 y 2014). Anteriormente ya se había observado que las células epiteliales de la mucosa colónica eran capaces de sintetizar PGE₂ (Rigas *et al.*, 1993; Mal *et al.*, 2011), LTB₄, 15-HETE (Wächtershäuser *et al.*, 2000; Shureiqi *et al.*, 2010) y 12-HETE (Mal *et al.*, 2011), alcanzando unas concentraciones entre 1-15 nM, 0,5-5 nM, 15-150 nM y 3-30 nM, respectivamente. Aplicando este nuevo método de análisis se observó que en ausencia de FBS, las células Caco-2 sintetizan, además de estos eicosanoides anteriormente mencionados, 5-HETE y 13-HODE, alcanzándose concentraciones en el medio de cultivo de entre 1 a 10 nM. Estas concentraciones se incrementaron hasta 5-25 nM en presencia de factores de crecimiento (FBS al 10%). Es interesante señalar que con esta metodología se ha observado, por primera vez, la síntesis de eicosanoides como el 5-HETE y el 13-HODE por estas células. En cambio, no detectamos la presencia de Cis-LTs como el LTD₄ que, sin embargo, Paruchuri *et al.* (2006) sí que lo detectan en el medio de cultivo por ELISA, aunque a una concentración de 5 pM que se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica que hemos utilizado (0.3 nM). Tampoco detectamos 20-HETE ni

ninguno de los EETs o sus metabolitos (DHETEs), que en cambio si producen otros tipos celulares como astrocitos, miocitos uterinos y células endoteliales (Alkayed *et al.*, 1996; Zelinski y Borlak, 2005; Pearson *et al.*, 2009). En el CRC, se ha observado un incremento de la síntesis de algunos de estos eicosanoides como la PGE₂ (Mal *et al.*, 2011), el LTB₄ (Liu *et al.*, 2003), el LTD₄ (Ekbon *et al.*, 1990) y el 5- y 12-HETE (Bortuzzo, 1996; Nielsen *et al.*, 2005) respecto a la mucosa colónica sana. Además existe una correlación positiva entre la concentración de algunos de estos eicosanoides, el tamaño del tumor y el desarrollo de metástasis (Tong *et al.*, 2005; Soumaoro *et al.*, 2006). Todos estos resultados establecen una relación entre la cascada del AA y el CRC.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman que PGs como la PGE₂, LTs como el LTB₄ y LTD₄, y HETEs como el 5-HETE y el 12-HETE y el 15-HETE son mitogénicos, resultados en consonancia con numerosos estudios en relación al papel de estos eicosanoides en la proliferación de células epiteliales intestinales (Bortuzzo *et al.*, 1996; Öhd *et al.*, 2000; Paruchuri *et al.*, 2003 y 2005; Wang y DuBois, 2008; Mal *et al.*, 2011). Es interesante señalar que el efecto proliferativo de estos eicosanoides se manifiesta a concentraciones alcanzadas en el medio de cultivo de las células Caco-2 y que se detectan en la mucosa intestinal de pacientes con CRC (Mal *et al.*, 2011; Zick *et al.*, 2011) como consecuencia de la síntesis por parte del epitelio y de los leucocitos infiltrados, especialmente macrófagos y mastocitos, que pueden inducir una liberación adicional de estos eicosanoides en la mucosa intestinal (Negus *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 2013). De hecho, se ha observado recientemente que la síntesis de diversos eicosanoides por macrófagos es muy superior a la producida por células epiteliales intestinales (Le Fauder *et al.*, 2013). De todas formas, no todos los eicosanoides tienen efecto proliferativo. Así, hemos observado que la PGD₂, producida principalmente por macrófagos y mastocitos (Roberts y Sweetman, 1985), no resulta mitogénica. Incluso podría tener un efecto antiproliferativo como se ha observado en ratones ApcMin/+ a los que se les ha suprimido el gen de la PGD₂ sintasa, enzima que sintetiza la PGD₂, y en los que se incrementa en un 50% el número de adenomas intestinales (Park *et al.*, 2007).

Tanto los HETEs como los HODEs presentan dos enantiómeros, distinguiéndose la forma S (sinister) y la forma R (rectus). Las formas R son sintetizadas principalmente por oxidación no enzimática del AA y LA, por la vía del CYP450 donde se sintetizan predominantemente R-HETEs y por el metabolismo de ciertas isoformas de las LOXs (Bylund *et al.*, 1998). Aunque hay pocos datos disponibles, las actividades biológicas de las formas R versus las formas S de los HETEs difieren. Por ejemplo, el 5-R-HETE se ha detectado en la mucosa colónica de ratón y en células epiteliales de pulmón donde actúa como un mediador en la respuesta inflamatoria (Bittleman y Casale, 1995;

Neilson *et al.*, 2012), pero no hay información sobre su efecto sobre el crecimiento celular. En cambio, se ha observado un aumento de la síntesis del 5-S-HETE, en pacientes con CRC. Además existe una correlación positiva entre su síntesis a través de la 5-LOX y el tamaño del tumor, así como con la evolución de la metástasis (Soumaoro *et al.*, 2006). En el caso del 12-HETE ambos enantiómeros presentan el mismo efecto tal y como describen Bortuzzo *et al.* (1996) en líneas celulares HT-29 y HCT-15. Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio confirman estos resultados utilizando células Caco-2. En el caso del 15-HETE, en nuestras condiciones experimentales, la mezcla racémica presenta un efecto proliferativo similar al observado por Battu *et al.* (1997) a concentraciones próximas a la detectada en la mucosa colónica de pacientes sanos (Shureiqi *et al.*, 2010). Se ha descrito que del 18 al 58% del 15-HETE presente en la mucosa colónica de ratón corresponde al enantiómero R (Neilson *et al.*, 2012) cuyo efecto en la proliferación celular por ahora se desconoce. En cambio, se ha descrito que el 15-S-HETE inhibe la proliferación celular y aumenta la apoptosis en células de CRC a través de su unión con PPAR γ (Bortuzzo *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003). Una hipótesis plausible que explicaría nuestros resultados con la mezcla racémica es que ambos enantiómeros tengan un efecto contrario y, por tanto, para determinar el efecto de dicho eicosanoide sería interesante poder estudiar el efecto de ambos enantiómeros por separado.

Como hemos mencionado anteriormente, las células Caco-2 también pueden producir metabolitos derivados del LA como el 13-HODE. Al estudiar el efecto de sus dos enantiómeros sobre el crecimiento de estas células, observamos que el 13-S-HODE tiene un efecto antiproliferativo, tal como había sido observado anteriormente (Kamitami *et al.*, 1998; Shureiqi *et al.*, 2001; Nixon *et al.*, 2004; Yoshinaga *et al.*, 2007; Zuo y Shureiqi *et al.*, 2013), mientras que hemos observado, por primera vez, que el 13-R-HODE presenta un marcado efecto proliferativo similar al observado en algunos HETEs. Estos resultados sugieren que ambos enantiómeros ejercen un efecto contrario sobre el crecimiento del epitelio intestinal y que el efecto de un enantiómero puede ser revertido por el otro. Esto podría explicar los resultados contradictorios descritos en diferentes estudios que utilizan la mezcla racémica (Dauchy *et al.*, 2012; Bull *et al.*, 2003). Por todo ello, sería interesante analizar la presencia de ambos enantiómeros tanto en el medio de cultivo de las células Caco-2 como en mucosa intestinal sana y patológica para entender su papel en el desarrollo del CRC.

El efecto mitogénico de la PGE $_2$, en nuestras condiciones experimentales se debe principalmente a su interacción con EP $_1$ y EP $_4$, receptores que presentan una mayor expresión que EP $_2$ y EP $_3$ en las células Caco-2 (Rodríguez-Lagunas *et al.*, 2010). Es interesante señalar que la participación de estos

receptores en el CRC se ha confirmado a través de su delección en ratones ya que estos fueron parcialmente resistentes a la inducción de ACF (Watanabe *et al.*, 1999 y 2000). Además, en ratones a los que se les había suministrado un carcinógeno y tratados con un antagonista del receptor EP₁ la incidencia de ACF disminuyó (Watanabe *et al.*, 1999 y 2000). Por otra parte, hay indicios de que el receptor EP₂ también tiene relación con la proliferación celular ya que el número y tamaño de pólipos intestinales en ratones *knockout* para este receptor es menor (Sonoshita *et al.*, 2001). A su vez, el efecto proliferativo del LTB₄ observamos que fue debido a su interacción con el receptor BTL₁ y BLT₂. Esta interacción del LTB₄ con estos dos receptores ya había sido demostrada en las células Caco-2 (Bortuzzo *et al.*, 1996) y en otras células epiteliales intestinales (Ihara *et al.*, 2007; Iizuka *et al.*, 2010). De forma similar el efecto mitogénico del LTD₄ es debido a su unión al CysLTR₁, receptor cuya presencia se ha descrito tanto en células Caco-2 como en el CRC (Öhd *et al.*, 2000 y 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Parhamifar *et al.*, 2005; Paruchuri *et al.*, 2006; Ihara *et al.*, 2007). Hasta el momento, no se han identificado receptores celulares para los HETEs y HODEs en células epiteliales, a excepción del 13-S-HODE que ha sido ampliamente descrito como un agonista de PPAR γ en líneas de células colorrectales y en el CRC (Shureiqi *et al.*, 2001; Bull *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2003; IL Lee *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2013). Esta unión del 13-S-HODE al PPAR γ sería la responsable del efecto antiproliferativo y apoptótico en las células Caco-2. Como era de esperar debido a su efecto mitogénico, hemos observado que el 13-R-HODE no es ligando del PPAR γ . Debido a la similitud de estructura entre los LTs y los HETEs y HODEs, estudiamos la posible interacción de estos metabolitos con los receptores BLT₁ y BLT₂. Nuestros resultados sugieren que el efecto mitogénico del 13-R-HODE es debido a su interacción con ambos BLTs. Además, nuestros resultados muestran, por primera vez en células epiteliales intestinales, que el receptor BLT₂ está implicado en el efecto proliferativo del 12-HETE, mientras que el receptor BLT₁ no parece tener un papel relevante. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el 12-S-HETE puede unirse a BLT₂ (Yokomizo *et al.*, 2001) o que su efecto biológico es BLT₂ dependiente (Kim *et al.*, 2008).

En numerosas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas la proliferación celular y la activación de la cascada del AA se inducen simultáneamente. Un ejemplo son los procesos de regeneración después de un daño tisular, procesos que están vinculados a un incremento en la liberación y metabolización del AA. Numerosos estudios surgieron el papel de las PGs en la regeneración de diversos epitelios del organismo, como por ejemplo la epidermis (Kaneko *et al.*, 1995; Talwar *et al.*, 1996; Moreno, 1997), el epitelio gástrico (Mizuno *et al.*, 1997) y el epitelio intestinal (Reuter *et al.*, 1996). Ante una lesión tisular, la respuesta fisiológica del organismo es la respuesta inflamatoria y tanto en el proceso inflamatorio como en el cáncer se incrementa la proporción del AA y/o el LA que

son oxidados a través de las vías de las COXs y de las LOXs, dando lugar a un aumento de la síntesis de eicosanoides (Coussens y Werb, 2002). Por ello, la inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo del AA, o la utilización de antagonistas receptoriales de PG y LT, afecta a la proliferación celular, tanto en células sanas como en células de diferentes tipos de tumores (Murakami *et al.*, 1998; Mann y DuBois, 2004). Así, todos los eicosanoides con actividad mitogénica generados por la cascada del AA podrían estar implicados en el crecimiento celular inducido por factores de crecimiento. De hecho, en nuestras condiciones experimentales, el crecimiento de las células Caco-2 inducido por FBS se reduce cuando se inhiben las vías de la cascada del AA implicadas en la síntesis de estos eicosanoides, así como cuando utilizamos antagonistas de los EPs, BLTs y receptores para Cis-LTs.

La incidencia de CRC es particularmente alta en países con alto consumo de carne roja y procesada, como Estados Unidos, Canadá, Australia y otros países occidentales, mientras que los países mediterráneos presentan menores tasas de CRC (Norat y Riboli, 2001). Se ha sugerido que esta menor de incidencia en los países mediterráneos puede ser debida en parte a una dieta con un elevado consumo de frutas, verduras, pescado y aceite de oliva (Kushi *et al.*, 1995). Wynder *et al.* (1969) sugirieron, basándose en datos obtenidos en la población de Japón, que el CRC es más frecuente cuando hay una elevada ingesta de grasas saturadas, mientras que hay menos incidencia en los individuos que consumen MUFAs y PUFAs. Sin embargo, existe una gran controversia sobre el efecto beneficioso del aceite de pescado en el CRC. Por una parte existen numerosos estudios que indican que el consumo de aceite de pescado reduce la incidencia del CRC (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research 2007 y 2011; Hull, 2011; Cockbain *et al.*, 2012). En cambio, hay estudios que indican que la incidencia de cáncer, incluido el CRC, no varía en los individuos que consumen una dieta con alto contenido de PUFAs ω -3 en forma de aceite de pescado (MacLean *et al.*, 2006; Virtanen *et al.*, 2008). En modelos animales y líneas celulares, los PUFAs ω -3 pueden disminuir la tasa de proliferación celular, que puede ser debida al efecto de los propios PUFAs ω -3, a la consecuente reducción de PUFAs ω -6, o bien, a la producción de metabolitos derivados del EPA con una hipotética actividad antiinflamatoria y antiproliferativa que no ha sido claramente demostrada experimentalmente.

La ingesta de EPA reduce la formación de PGs oncogénicas *de la serie 2* como PGE₂ a favor de la producción de PGs *de la serie 3* como la PGE₃, metabolito que se ha propuesto como inductor de un menor crecimiento celular que la PGE₂ (Petrik *et al.*, 2000; Baga *et al.*, 2003). Sorprendentemente, en nuestras condiciones experimentales, la PGE₃ presenta un efecto proliferativo similar a su homólogo

derivado del AA, la PGE₂. Estos resultados discrepan con estudios que indican que la PGE₃ tiene actividad antitumorogénica (Roynette *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2014) aunque están de acuerdo con un metaanálisis sobre el papel del EPA en el cáncer que concluye que el EPA y la PGE₃ no tienen un efecto beneficioso en el CRC (MacLean *et al.*, 2006). Diversos estudios sugieren que la PGE₃ comparte los mismos receptores n la PGE₂ pero con diferentes afinidades. Así, aunque la afinidad de la PGE₃ para EP₄ es similar a la de la PGE₂, se ha descrito que la afinidad de la PGE₃ por el receptor EP₁ es significativamente inferior (Smith, 2005; Wada *et al.*, 2007). Esta menor afinidad se ha utilizado para explicar su efecto antiproliferativo. Sin embargo, nuestros resultados indican que el efecto proliferativo de la PGE₃ es consecuencia de la interacción con ambos receptores. Por el contrario, el LTB₅ no muestra el efecto proliferativo que presenta el LTB₄ en células Caco-2, de forma similar a lo observado en otras líneas celulares de carcinoma de colon humano (Bortuzzo *et al.*, 1996). Esta falta de efecto mitogénico del LTB₅ es similar a su falta de efecto quimiotáctico (Moreno, 2009) que reducirá la infiltración de leucocitos en el tumor y consecuentemente, la síntesis de eicosanoides. Es necesario profundizar en las investigaciones sobre estos efectos, ya que podrían explicar parcialmente el posible efecto beneficioso del EPA en el CRC. Hasta el momento, el efecto biológico de los HEPEs, metabolitos sintetizados también a partir del EPA, se desconoce. De hecho sólo existe un estudio reciente en ratas con artritis donde se demuestra la correlación entre los niveles en suero de este eicosanoide y la inflamación (Ding *et al.*, 2014). En esta tesis hemos demostrado que el 12-HEPE induce la proliferación de las células Caco-2 de forma similar al 12-HETE y que este efecto es debido a su interacción con el receptor BLT₂.

La proliferación celular es consecuencia de la activación simultánea de varias vías de señalización intracelular que incluyen distintas cascadas de quinasas como SOS-RAS-RAF-MAPK-ERK, JNK y p38, o las vías PI3K/Akt o Wnt/ β -catenina (Del Peso *et al.*, 1997) que provocan la transducción de genes mitogénicos. En este trabajo hemos observado que la PGE₂ activa la vía ERK 1/2, en consonancia con el estudio de Cherukuri *et al.* (2007) que utilizó células HCA-7 de CRC. Esta misma vía también se activa en presencia de LTB₄ y el LTD₄, tal y como se había descrito previamente (Paruchuri *et al.*, 2003 y 2006; Nielsen *et al.*, 2003; Ju *et al.*, 2005; Ihara *et al.*, 2007). Además, hemos observado por primera vez la activación de esta vía en presencia de 13-R-HODE. En este sentido, Sauer *et al.* (1999) observaron que el 13-HODE activa la vía ERK en el CRC, aunque no diferenciaban entre los dos enantiómeros. También hemos observado que la PGE₂ provoca una activación de p38 en las células Caco-2, de forma similar a la descrita por Leone *et al.*, (2007) en el mismo tipo celular, y una activación de cAMP/PKA que ya había sido demostrada por nuestro grupo en células Caco-2 diferenciadas (Rodríguez-Lagunas *et al.*, 2010). Recientemente Grossi *et al.* (2014) han señalado la

importancia de la activación de la vía p38 en el CRC. Aunque no se conocían las vías de señalización inducidas por 12-HETE en células Caco-2, hemos observamos que activa exclusivamente la vía p38. Sin embargo, en estudios con otros modelos experimentales, tales como células de cáncer gástrico, fibroblastos y células de melanoma, se ha observado que este eicosanoide también activa ERK 1/2 (Chen *et al.*, 2008; Nieves y Moreno, 2008; Kang *et al.*, 2013). Uno de los factores de transcripción inducido por estímulos mitogénicos mejor caracterizado es CREB. Estos estímulos activan diversas protein kinases como PKA, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs), ERK y p38 (Tan *et al.*, 1996; Shaywitz y Greenberg, 1999), que fosforilan CREB en un residuo de serina 133, que es imprescindible para su transcripción. Recientemente se ha descrito que una activación de ERK (Cherukuri *et al.*, 2007) o de cAMP/PKA (Hong *et al.*, 2013) da lugar a una posterior activación de CREB en líneas celulares de CRC, tal como hemos observado que ocurre en células Caco-2 estimuladas con PGE₂, LTD₄ y 13-R-HODE. Está bien documentado que PGE₂, a través de los receptores EP₂ y EP₄, puede aumentar los niveles intracelulares de cAMP, que actúa como una segunda molécula mensajera que conduce a la activación de PKA y la fosforilación de CREB (Hawcroft *et al.*, 2007). Así mismo, se ha demostrado que PGE₂, a través del receptor EP₄, activa ERK 1/2 (Regan, 2003) y esto conduce a la fosforilación de CREB (Cherukuri *et al.*, 2007). En el caso del LTD₄ y 13-R-HODE no hay información previa sobre una posible activación de CREB a través de ERK 1/2, pero nuestros resultados muestran que la activación de CREB por 13-R-HODE es ERK 1/2 dependiente. En el caso de la vía Akt 1/2, Tessner *et al.* (2004) muestran que la PGE₂ induce su activación en células epiteliales HCT-116 sometidas a radiaciones. Sin embargo, no hemos apreciado esta activación de la vía Akt 1/2, de acuerdo con Repasaky *et al.* (2007) que utilizó células epiteliales intestinales de rata. Esta aparente contradicción podría deberse a que las radiaciones activan vías de señalización celular como Akt (Valerie *et al.*, 2007). Hemos observado por primera vez que todas estas vías de señalización activadas por PGE₂ también son activadas cuando las células Caco-2 se incuban con PGE₃, siendo estos dos eicosanoides los que nos activan simultáneamente más vías de señalización (Tabla 4.1).

En células de CRC se ha descrito también una activación de la vía Wnt/ β -catenina con un incremento de la defosforilación de β -catenina (Shao *et al.*, 2005; Castellone *et al.*, 2006). Sin embargo, no hemos observado cambios en esta vía cuando las células Caco-2 se incubaron con diversos eicosanoides como PGE₂, LTB₄, 12-HETE o 13-R-HODE. Es importante considerar que estas células presentan una mutación en APC, en la región responsable de la unión con la β -catenina, ocasionando una importante defosforilación basal de β -catenina, lo cual podría explicar la incapacidad

de estos eicosanoides para inducir una defosforilación adicional en estas células. No obstante, Pai *et al.* (2003) si que observan una activación de esta vía inducida por PGE₂ aunque a concentraciones muy superiores a las fisiológicas. En cambio, en el caso del LTD₄ si que observamos este efecto a una concentración de 10 nM, tal y como ya había sido descrito previamente (Öhd *et al.*, 2000). Además, hemos observado que la PGE₂ incrementa la fosforilación de GSK-3β en células Caco-2, tal como ya se había descrito previamente (Shao *et al.*, 2005). Esta activación de GSK-3β provoca una fosforilación de β-catenina que induce su degradación proteolítica (Rubinfeld *et al.*, 1996), por lo cual no se transloca al núcleo donde activaría factores de transcripción (Shao *et al.*, 2005). Así Tuynman *et al.*, (2008) indican que las células de CRC que presentan la mutación APC incrementan la actividad de GSK-3β que aumenta la fosforilación de β-catenina y la subsiguiente disminución de la actividad transcripcional de la vía de Wnt. Estos hechos podrían explicar la falta de defosforilación de la β-catenina inducida por PGE₂ en nuestro modelo experimental.

Para entender el diferente perfil de activación de las vías de señalización de estos eicosanoides, hay que considerar a qué tipo de receptores se unen, qué efecto tiene esta interacción sobre el AMPc y qué niveles de PGE₂ se alcanzan en estas condiciones. Así, la interacción con BLT₁ o BLT₂ puede disminuir el AMPc (Okuno *et al.*, 2015), mientras que la interacción con Cis-LT₁R no modifica este parámetro (Lee *et al.*, 2009). Por otro lado, el LTD₄ y el 13-R-HODE producen una mayor síntesis de PGE₂ que el LTB₄ o el 12-HETE y quizás debido a esto pueden producir un incremento superior del AMPc a través de la interacción PGE₂/EP₄. Esto explicaría que el LTD₄ y 13-HODE activen CREB (Figuras 4.1 y 4.2).

Tabla 4.1. Vías de señalización activadas por parte de los metabolitos derivados del AA, EPA y LA.

	ERK	CREB	β -catenina	p38	GSK-3	Akt-1	Akt-2
PGE₂	++	++	-	++	++	-	-
PGE₃	++	++	-	++	++	-	-
LTB₄	+	-	-	-	-	-	-
LTD₄	+	+	++	-	-	-	-
12-HETE	-	-	-	++	-	-	-
13-R-HODE	++	+	-	-	-	-	-

++ activación elevada, + activación significativa, -no activada

La propia PGE₂ y diversos eicosanoides pueden activar la vía de las COXs. De hecho, el LTB₄ cuando interacciona con BLTs induce la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE₂ en fibroblastos sinoviales humanos (Zhai *et al.*, 2010). Los LTs también inducen la expresión de las COXs en células intestinales epiteliales humanas. Así, Wikström *et al.* (2003) observan que la interacción de LTD₄ con su receptor estimula la expresión de COX-2 en células Caco-2 y Öhd *et al.* (2000) muestran que tanto el LTD₄ como el LTB₄ inducen la síntesis de PGE₂ en estas células. Dado que la PGE₂ es el eicosanoide que activa de forma simultáneamente un mayor número de vías de señalización mitogénicas en las células Caco-2, nos planteamos la hipótesis de que el efecto proliferativo tanto de los LTs como de los HETEs y HODEs podría ser COXs/PGE₂ dependiente. Confirmandolo, hemos observado que el efecto proliferativo inducido por LTB₄, LTD₄, 12-HETE, 12-HEPE y 13-R-HODE es revertido por inhibidores de las COXs y por antagonistas receptoriales de EP₁ y EP₄. Además, estos metabolitos inducen significativamente la síntesis de PGE₂ y las vías de señalización inducidas por estos metabolitos e implicadas en sus efectos proliferativos quedan bloqueadas en presencia de un inhibidor de las COXs. Por todo ello proponemos que el diferente perfil de activación de las vías de

señalización de estos eicosanoides depende del tipo de receptor al que se unen, del efecto que tiene esta interacción sobre el AMPc y de los niveles de PGE₂ que se alcanzan en estas condiciones. Así, la interacción con BLT₁ o BLT₂ puede disminuir el AMPc (Okuno *et al.*, 2015), mientras que la interacción con Cis-LT₁R no modifica este parámetro (Lee *et al.*, 2009). Por otro lado, el LTD₄ y el 13-R-HODE producen una mayor síntesis de PGE₂ que el LTB₄ o el 12-HETE y quizás debido a esto pueden producir un incremento superior del AMPc a través de la interacción PGE₂/EP₄. Esto explicaría que el LTD₄ y 13-HODE activen CREB (Figuras 4.1 y 4.2). Es interesante remarcar que el LTD₄ es el único eicosanoide de los estudiados que ha sido capaz de producir una defosforilación adicional de β-catenina a la ya presente en estas células, efecto que no sería PGE₂ dependiente y que no está implicado en el efecto proliferativo del LTD₄ sobre las células Caco-2. Sin embargo, esta defosforilación de β-catenina inducida por LTD₄ podría estar implicada en otros mecanismos tumorigénico, como el incremento de la migración de las células tumorales que ha descrito recientemente Salima *et al.* (2014). Además, este trabajo demuestra por primera vez que HETEs y HODEs pueden activar la vía COXs y por tanto, una afectación de la vía de las LOXs reducirá de forma indirecta la producción de PGE₂ y como consecuencia de esto, la proliferación de las células Caco-2. Este mecanismo puede explicar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de estas células que presentan inhibidores de la vía de las LOXs y antagonistas receptoriales de los LTs. De hecho, el zileuton, un inhibidor de la 5-LOX, inhibe la síntesis de LTs y reduce el CRC (Melstrom *et al.*, 2008). Se ha observado que la combinación de un inhibidor de la 5-LOX y otro de la COX-2 produce una mayor inhibición del crecimiento del tumor (Cianchi *et al.*, 2006; Mohammed *et al.*, 2011) y que está acompañada de una disminución de la concentración de PGE₂ y LTB₄ (Ye *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que las vías de las COXs y LOXs están involucradas, además de en el control de la proliferación, en la regulación de otros procesos implicados en el CRC como pueden ser la angiogénesis y la metástasis.

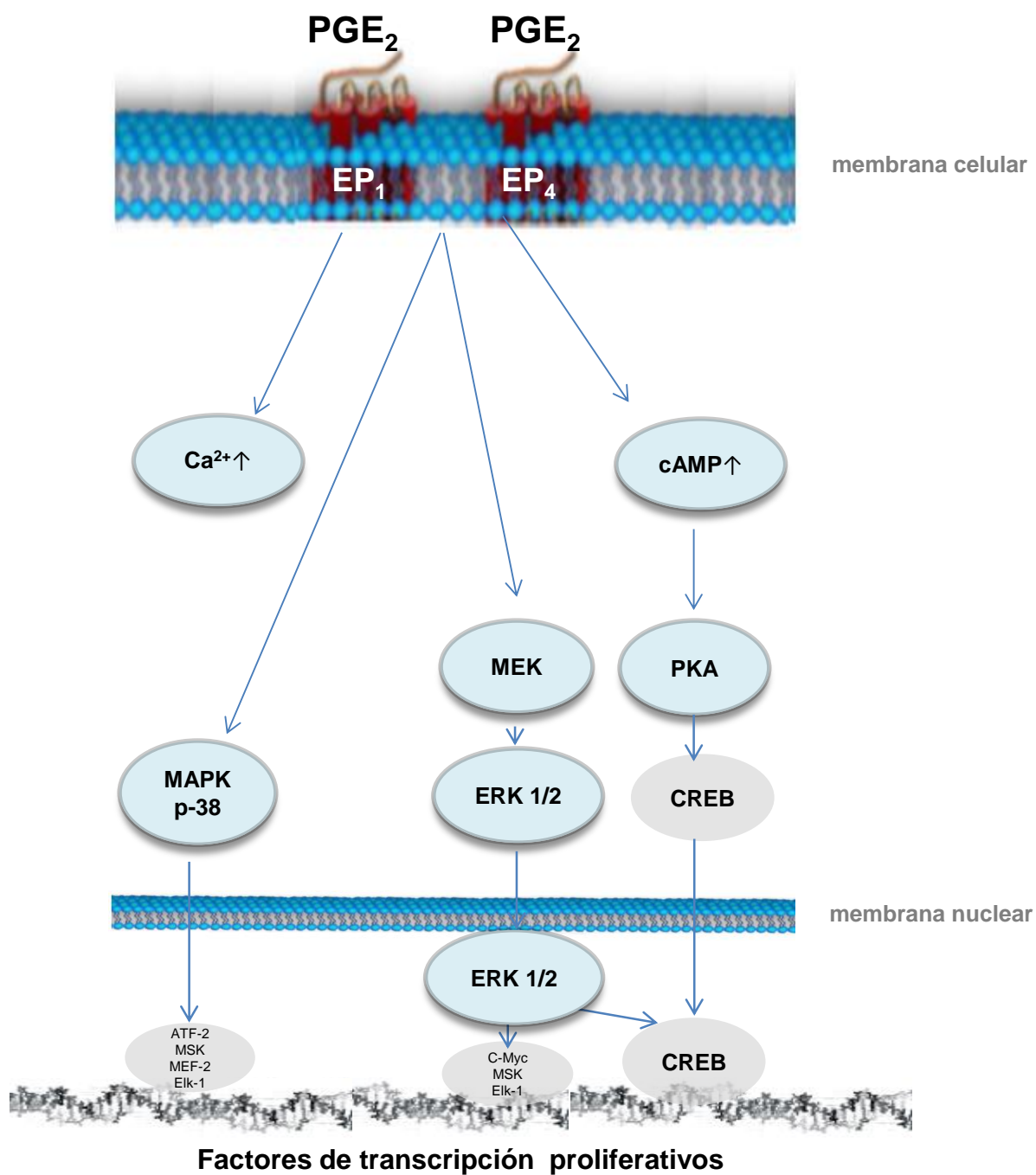


Figura 4.1. Efecto de la PGE₂ sobre las vías de señalización implicadas en el control del crecimiento celular.

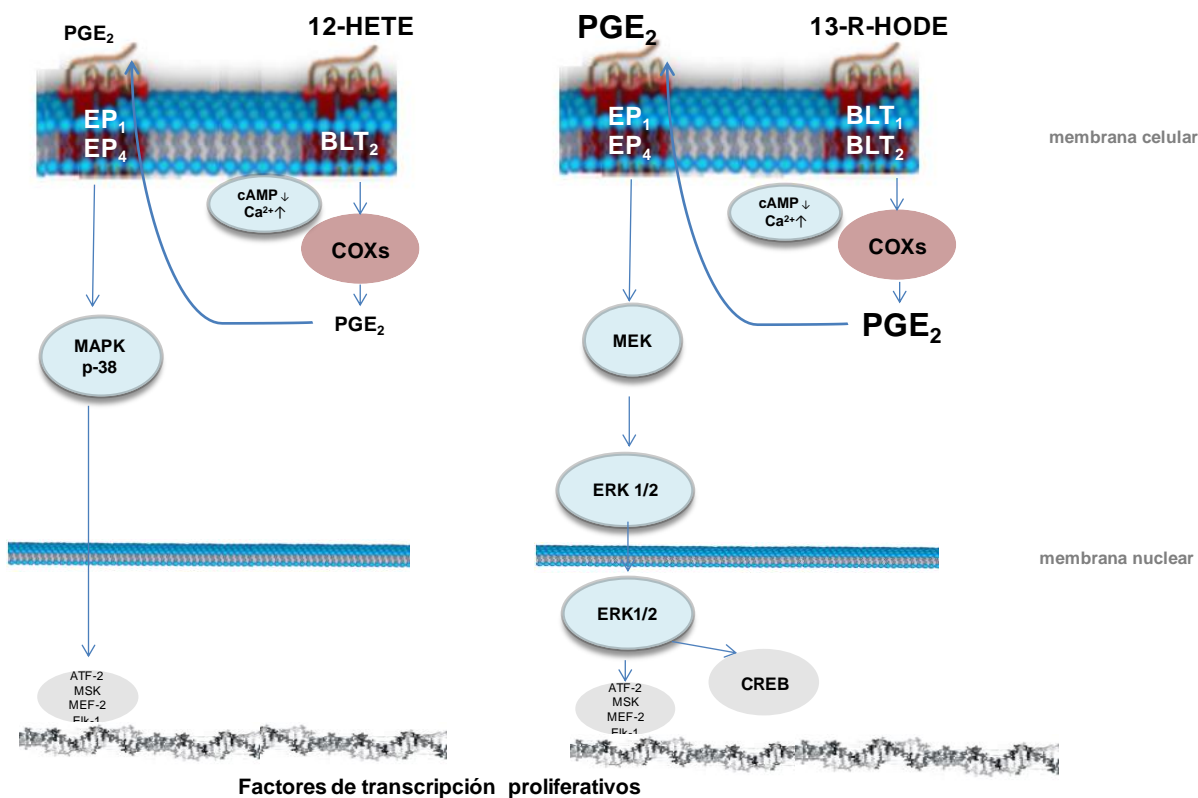
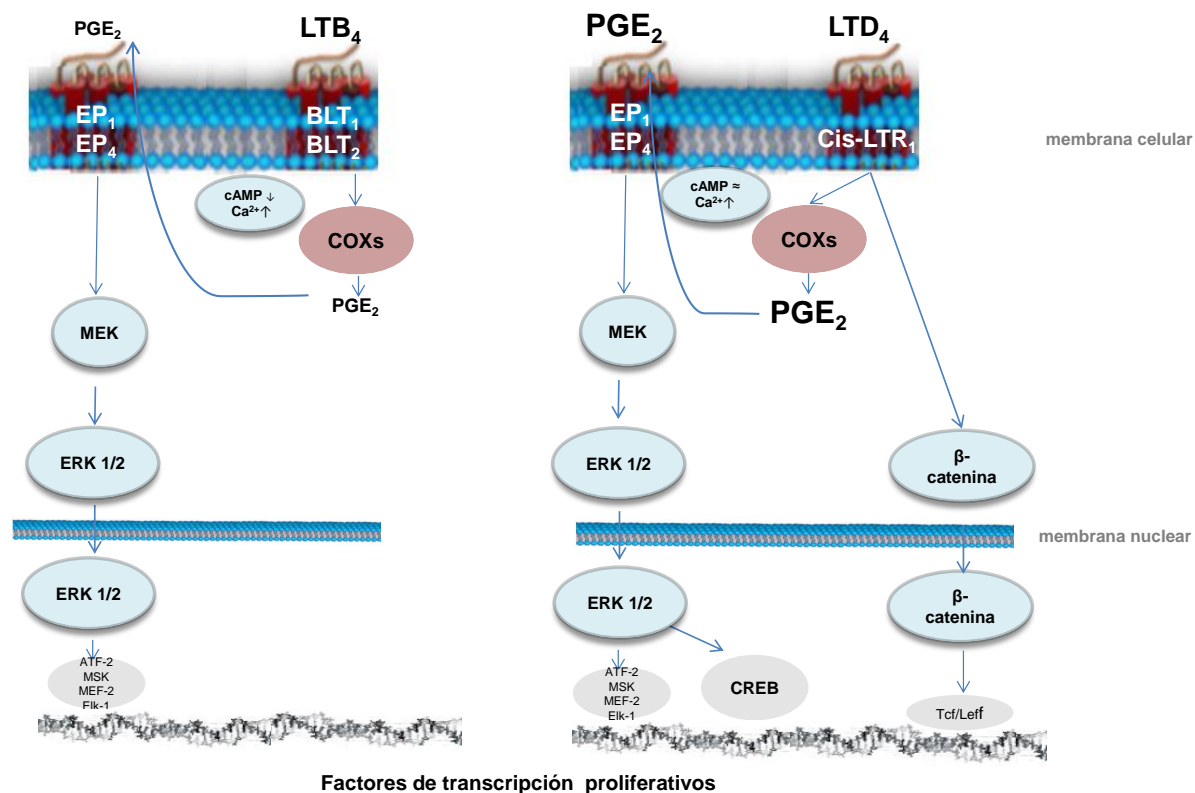


Figura 4.2. El efecto proliferativo de LTs, 12-HETE y 13-R-HODE depende de la activación de la vía COXs y la síntesis de PGE₂ (PGE₂ representa una mayor concentración que PGE₁).

La alteración de la vía de las COXs está ampliamente descrita en el CRC. Así, la PGE₂ es la PG derivada de la vía de las COXs que presenta concentraciones significativamente más altas en el tejido tumoral en comparación con la mucosa colónica normal (Rigas *et al.*, 1993; Mal *et al.*, 2011). La PGE₂ regula diversos mecanismos implicados en desarrollo del CRC como la inhibición de la apoptosis, la estimulación de la proliferación celular, induce la angiogénesis y suprime la respuesta inmune antitumoral (Gately y Li, 2004; Kaur y Sanyal, 2010). Por otra parte fármacos que inhiben la COX-2 reducen significativamente el CRC. Desde el año 1988, diferentes estudios epidemiológicos demuestran el efecto de la aspirina en la incidencia de la CRC y el desarrollo de adenomas (Kune *et al.*, 1988). Actualmente, el celecoxib es el único inhibidor de la COX-2 aprobado por la FDA para el tratamiento de los pólipos de colon y recto (Bombardier *et al.*, 2000). En estos momentos la utilización de los AINEs como quimioprotectores del CRC depende de evitar sus efectos adversos a nivel cardiovascular (Vaish *et al.*, 2013). De acuerdo con estas evidencias que indican un papel clave de la sobreexpresión de las COXs en el desarrollo del CRC, nuestros resultados surgieron que la proliferación celular inducida por los eicosanoides y HODEs mencionados es a través de la activación de la vía de las COXs (Figura 4.2). En conjunto, estos estudios proporcionan nuevas evidencias para la aplicación de antagonistas de los receptores EP₁ y EP₄ en el tratamiento de neoplasias que podrían evitar los efectos adversos asociados a los tratamientos que inhiben las COXs.

