

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ROL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO
ARAQUIDÓNICO EN LA MODULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN GÉNICA NEOPLÁSICA”**

Biol. ANDREA COMBA

Director: Dr. Aldo R. Eynard

*INICSA, CONICET
y Cátedra de Biología Celular, Histología Y Embriología.
Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Córdoba*



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina
2013

COMISIÓN ASESORA

Dr. Aldo R. Eynard, Cátedra de Biología Celular Histología y Embriología, Facultad de ciencias medicas, UNC. INICSA-CONICET

Dra. Marta Suarez, Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC.

Med. Martín E. Fernández Zapico, Schulze Center for Novel Therapeutics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*A mis papás Raúl y Zulema,
a mi hermana Paula
y a Kape mi amor*

AGRADECIMIENTOS

- ✦ A mi Director el Dr. Aldo Eynard, por su guía y enseñanza, por su ayuda y confianza durante todos estos años.
- ✦ A mi mentor y Co-director de beca CONICET, Martín Fernandez Zapico por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su tiempo y disposición para ayudarme y toda su enseñanza incondicional.
- ✦ A mi mentora y madre de laboratorio Eugenia por su ayuda incondicional, por todo su apoyo, enseñanza, cariño y consejos a lo largo de estos años.
- ✦ A los miembros de la Comisión Asesora por su guía y disponibilidad en esta tesis.
- ✦ Al CONICET por haberme otorgado la Beca Doctoral TIPO I y TIPO II que me permitieron realizar y llevar a cabo esta tesis.
- ✦ A mis amigos y compañeros de laboratorio Marianela, Fernanda, Cintia, Gina, Elio y sus chicas, Renata, Patry, Yanet, Dani, Gastón, Mariana, Isabel, María José, Ale Berra, Ricardo, El grupo de Epidemio, Marcela, Patricia, Gustavo, Alejandro, Mabel por tantos inolvidables momentos compartidos, por su ayuda y disponibilidad en todo momento.
- ✦ A Mirta por toda su ayuda y consejos, su apoyo total y las buenas charlas.
- ✦ A mis compañeros del laboratorio de Rochester que me enseñaron y ayudaron en todo momento y por su hermosa amistad, especialmente a Luciana, Maite, Silvana, Nelmary y Vladimir.
- ✦ A mis padres, por su amor, por estar siempre, por entenderme, alentarme y apoyarme, en todos estos años.
- ✦ A mi hermana Paula, por su cariño y consejos, por estar ahí siempre.
- ✦ A mi amor y compañero de vida Kape por su apoyo y entusiasmo incondicional, por su amor, por hacerme muy feliz.
- ✦ A mis abuelos, mi tía tata, mi madrina, mi tío Claudio y mis primos Camila y Marcos por su inmenso cariño.
- ✦ A Victor, Tere, Mariela, Octi, Abuela y Agosto por su inmenso cariño.
- ✦ A mis amigas Laura G, Oli, Laura M, Ceci, Belen por los momentos compartidos.
- ✦ A mis amigos de toda la vida por estar siempre y seguir caminando juntos.
- ✦ Y a todos los que de alguna manera formaron parte de mi vida en estos años para que pueda llegar hasta acá.

TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

- **Comba Andrea**, Pasqualini María Eugenia. Primers on Molecular Pathways – Lipoxygenases: Their Role as an Oncogenic Pathway in Pancreatic Cancer. **Pancreatology** 2009; 9: 724-728. Review.
- Rizvi S, Demars CJ, **Comba A**, Gainullin VG, Rizvi Z, Almada LL, Wang K, Lomberk G, Fernández-Zapico ME, Buttar NS Combinatorial Chemoprevention Reveals a Novel Smoothed-Independent Role of GLI1 in Esophageal Carcinogenesis. **Cancer Research**. 2010; 70(17):6787-96.
- **Comba A**, Maestri DM, Berra MA, Garcia CP, Das UN, Eynard AR, Pasqualini ME. Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. **Lipids Health Dis**. 2010; 9:112.
- **Comba A**, Eynard AR, Fernández-Zapico ME, Pasqualini ME. Basic Aspects of Tumor Cell Fatty Acid-Regulated Signaling and Transcription Factors. **Cancer Metastasis Review**. 2011;30(3-4):325-42. Review.
- Zheng X, Rumie Vittar NB, Gai X, Fernandez-Barrena MG, Moser CD, Hu C, Almada LL, McCleary-Wheeler AL, ElSawa SF, Vrabel AM, Shire AM, **Comba A**, Thorgeirsson SS, Kim Y, Liu Q, Fernandez-Zapico ME, Roberts LR. The Transcription Factor GLI1 Mediates TGF β 1 Driven EMT in Hepatocellular Carcinoma via a SNAI1-Dependent Mechanism. **PLoS One**. 2012;7(11):e49581.
- **Andrea Comba**, Maria E. Pasqualini, Marianela Vara Messler, Renata Silva, Maite G. Fernández-Barrena, Anne Vrabel, Aldo R. Eynard, Martin E. Fernandez-Zapico. Downregulation of GLI1 underlies the anti-tumoral properties of araquidonic acid. (Manuscrito en preparación para JBC).
- Garcia CP., Lamarque A., **Comba A.**, Berra MA., Silva RA., Labuckas DA., Das UN., Eynard AR., Pasqualini M.E. Synergistics effects of melatonin and Dietary PUFAs on the development of an experimental murine mammary gland adenocarcinoma. (Manuscrito en preparación para Nutrition)

Publicaciones de Resúmenes en Revistas con Referato.

- Sumera Ilyas, Cathrine J. DeMars, **Andrea Comba**, Vladimir Gainullin, Jing Jing Han, Lori S. Ltuzke, Martín E. Fernandez-Zapico, Navtej Buttar. “Combination Chemoprevention Reveals a Novel Hedgehog Independent Role of GLI1 in Esophageal Carcinogenesis”. **Gastroenterology** 2009 Vol. 136, Issue 5, Supplement 1, Page A-91. ISSN: 0016-5085
- **Comba, A.** Artal, L. J. Pena-Sánchez, D. Billadeau, M. E. Fernandez-Zapico. “EGF Signaling: A Novel Regulator of Gli1 Oncogenic Activity In Pancreatic Cancer”. **Pancreatology** 2010; 10:259–400. ISSN: 1424-3903
- **Comba A.**; Pasqualini M E, Vara Mesler M, Brunotto M, Valentich M A, Fernandez-Zapico M E, Eynard A R. 12-lipoxygenasa (12-LOX), un nuevo regulador de la función antiapoptótica del factor de transcripción GLI1 en células cancerosas. **Medicina** 2010. Vol: 70 Sup. 2. ISSN: 0025.7680.
- Vara Messler M, Soria EA, **Comba A**, Silva R, Pasqualini ME, Valentich MA. Efecto Diferencial De PUFAs Dietarios Ω -3 Y Ω -6 Sobre La Actividad De Enzimas Oxidativas En Células Esplénicas De Un Modelo Tumoral Murino: Resultados Preliminares. **Revista Facultad Ciencias Medicas.**
- **Comba A**, Pasqualini M E, Vara Mesler M, Silva R, Valentich M A, Fernandez-Zapico M E, Eynard A R. Vía Metabólica AA-12-LOX-Hetes En La Modulación De La Actividad Transcripcional De GLI1 En Células Cancerosas Epiteliales De Mama Y Páncreas. **Revista Facultad Ciencias Medicas.** Vol: 68. Sup: 1/2011.pg: 86 ISSN: 0014.6722.
- **Comba A**, Vara Messler M, Silva RA, Fernandez-Zapico ME, Eynard AR, Pasqualini ME. Analysis of the role of arachidonic acid signaling on tumor cell growth. **BIOCELL** Vol. 36 Supl, 2012, pg: 105. ISSN: 0327. 9545.
- Vara Messler M, **Comba A**, Buccellati C, Sala A, Valentich MA .Pasqualini ME. Effect Of Essential Fatty Acid On Cell Survival In An In-Vitro Model Of Breast Cancer. **BIOCELL** Vol. 36 Supl, 2012, pg: 105. ISSN: 0327. 9545.
- **Comba A**, Pasqualini ME, Vara Messler M, Silva RA., Garcia FB. M, Fernandez-Zapico ME, Eynard AR. Downregulation of GLI1-dependent survival pathway underlies arachidonic acid anti-tumoral activity. **BIOCELL** Vol. 37 Supl, 2013, pg: 37. ISSN: 0327. 9545.

INDICE

ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
SUMMARY.....	13
I- INTRODUCCION.....	14
I-1. ANTECEDENTES.....	14
I-1.1 Cáncer: Incidencia y Mortalidad.....	14
I-1.2 Biología Celular y Mecanismos Moleculares del Cáncer: Inicio y Progresión.....	15
I-1.3 Factores que Intervienen en el Desarrollo del Cáncer.....	20
I-1.4 Metabolismo de los Lípidos: Biosíntesis de Ácidos Grasos.....	22
I-1.5 Ácidos Grasos y Sus Metabolitos Derivados: Oxidación Enzimática y No Enzimática.....	26
I-1.6 Papel de los Ácidos Grasos en Células Normales y Tumorales.....	31
I-1.7 Ácidos Grasos Poliinsaturados Exógenos Como Moduladores del Proceso Carcinogénico.....	33
I-1.8 Regulación de la Expresión Génica Por Ácidos Grasos.....	35
I-1.8.1 Efectos Directos e Indirectos de los Ácidos Grasos sobre los Factores de Transcripción.....	36
I-1.9 El Factor de Transcripción GLI1, Como Regulador de la Expresión Génica Neoplásica.....	40
I-2 HIPOTESIS.....	44
I-3 OBJETIVOS.....	44
II- ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA.....	46
II-1. Modelos in vivo, ex-vivo.....	46
II-1.1. Evaluación del crecimiento tumoral.....	46
II-1.2. Ensayo de apoptosis en células del tejido tumoral.....	47
II-1.3. Análisis de Incidencia de metástasis en pulmón.....	47
II-2. Modelo in Vitro.....	48
II-2.1. Líneas Celulares y condiciones de cultivo.....	48
II-2.2. Plásmidos utilizados.....	48
II-2.3. Tratamiento celular.....	49

II-2.4. Ensayo de viabilidad celular.....	50
II-2.5. Ensayo de Apoptosis.....	50
II-2.5.1. Análisis de apoptosis por microscopia de fluorescencia.....	50
II-2.5.2. Ensayo fluororimétrico de Caspasas 3/7.....	51
II-2.6. Tranfecciones celulares transitorias.....	51
II-2.7. Actividad Transcripcional: Ensayo Reportero de Luciferasa.....	52
II-2.8. Transcripción Reversa– Reaccion en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR).....	52
II-2.9. Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (CHIP).....	53
II-2.10. Western Blot.....	54
II-2.11. Determinación de ácidos grasos de membrana de células tumorales por GLC.....	54
II-2.12. Determinación de Peroxidación Lipídica no Enzimática.....	55
II-2.12.1. Técnica de “Ferric Xilenol Orange” (FOX).....	55
II-2.12.2. Técnica de Gama Glutamil Transpeptidasa (GGT).....	55
II-2.13. Determinación de Peroxidación Lipídica Enzimática (LOXs y COXs) por HPLC.....	56
II-2.14. Análisis Estadístico.....	57
III- RESULTADOS.....	58
III-1. El AA Exógeno es Incorporado en las Membranas Celulares	58
III-2. El AA Disminuye el Crecimiento Tumoral e Induce Apoptosis <i>In Vivo</i>	59
III-3. El AA Disminuye la Incidencia de Metástasis en Pulmón.....	61
III-4.El AA Disminuye la Viabilidad Celular e Induce Apoptosis en Células Cancerigenas de Mama y Páncreas.....	62
III-5.El Tratamiento con AA Disminuye la Expresión de los Genes Anti- Apoptotico Bcl-2, Bfl-1/A1 Y 41bb Mediante Represión del Promotor.....	65
III-6. El AA Disminuye la Expresión y Actividad Trascricional del Factor de Transcripción Oncogénico GLI1.....	67
III-7. La Sobreexpresión de GLI1 Revierte el Efecto Del AA en la Inducción de Muerte Celular y Activación de GLI1.....	71
III-8. Las Proteínas Antiapoptóticas Bcl-2, Bfl-1 Y 4-1bb son Genes Diana de la Actividad Transcripcional De GLI1.....	73
III-9. El AA Reprime la Actividad del Promotor de GLI1 Mediante la Inducción de	

la Actividad Represora del Factor de Trascricpción NFATc11 y Disminución Dde H3-K14-Ac.....	76
III-10. Las Vías Metabólicas del AA Participan en la Regulación de la Actividad del Promotor de GLI1.....	80
IV- DISCUSIÓN.....	85
V- CONCLUSIONES.....	94
VI- BIBLIOGRAFÍA.....	96

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonil glicerol
AA	Ácido araquidónico
AEA	Araquidonil etanol amina
AG	Ácido graso
ALA	Ácido Linolénico
ATX	Enzima autoxina
CHIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
COX	Ciclooxigenasa
DAGL	Diacil Glicerol Lipasa
DGLA	Ácido diomo-gama-linolenico
DHA	Ácido Docosaenoico
DiHETEs	Ácidos dihydroxeicosatrienoico
ECBS	Endocannabinoides
EETs	Ácidos epoxyeicosatrienoicos
EFA	Ácidos Grasos Esenciales
EPA	Acido eicosapentanoico
GLC	Cromatografía Líquida de Gas
GLI1	Factor de Transcripción oncogénico asociado a gliomas
H3K14Ac	Histona 3 acetilada en Lisina 14
H&E	Hematoxilina y Eosina
HEPES	Ácidos hydroxeicosapentaenoico
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenoico
HH	Hedgehog
HODE	Ácidos hydroxyoctadecadienoico
HPETES	Ácidos hydroxyperoxyeicosatetraenoicos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
Hxs	Hepoxilinas
IgG	Inmunoglobulina
LA	Ácido Linoleico
LOX	Lipoxigenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico

LPC	1-O-alkyl-lisofosfatidil colina
LPL	Lisofosfolipidos
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MAPK	Proteína quinasa activada mitogénica
MUFA	Ácidos Grasos Mono Insaturados
NAPE	N-acil-fosfatidil etanol amina
NFκB	Factor nuclear kappa B
NFATc1	Factor nuclear de celulas T activadas, citoplasmático 1
OA	Ácido Oleico
P450	Citocromo p450
PA	Ácido Palmitoleico
PAF	Factor Activador de plaquetas
PC	Fosfatidil colina
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína Kinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptor activador de la proliferación peroxisomal
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
PTCH1	Receptor de membrana de la familia “Patched”
qPCR	Reaccion en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RT-PCR	Trasncipcion Reversa- Reaccion en Cadena de la polimerasa
SA	Ácido Esteárico
SMAD3	Proteina Citoplasmatica “Mothers against decapentaplegic homolog 3”
SMO	Receptor acoplado a proteínas G “Smoothened”
Sphk1	Esfingosina Kinasa 1
Src	Src-Tirosina Kinasa proto-oncogén
TGFβ	Factor de crecimiento tumoral beta
TXs	Tromboxanos
WB	Western Blot

Se utilizan abreviaturas en Ingles.

RESUMEN

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales, tanto nuestros como de otros laboratorios, han demostrado consistentemente que los ácidos grasos poliinsaturados PUFAs y sus derivados por acción de las enzimas Lipoxigenasas (LOXs) y Cicloxigenasas (COXs), como los eicosanoides, así como lípidos bioactivos surgidos de la síntesis no enzimática de hidroperóxidos, modulan el proceso carcinogénico. Particularmente, ha sido establecido el efecto citotóxico de los PUFAs en diferentes tipos de cánceres. En este contexto, se ha observado que niveles elevados de PUFAs inhiben el crecimiento tumoral. Además, se ha observado en diferentes estudios que los ácidos grasos (AGs) así como sus derivados lipídicos, activan vías de señalización celular produciendo cambios específicos en la expresión génica afectando la proliferación y muerte celular, la migración y producción de matriz extracelular. Aunque ha sido demostrada la implicancia de los PUFAs y sus derivados en diferentes etapas de la carcinogénesis, la identidad de los derivados lipídicos involucrados en la modulación de la expresión genética durante la transformación neoplásica, así como los mecanismos utilizados por estas moléculas, son desconocidos. Nuestros resultados aportan evidencias que respaldan los efectos antitumorales del PUFA ácido araquidónico (AA) tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Así observamos que el tratamiento con AA disminuye el crecimiento tumoral, la incidencia de metástasis y aumenta la apoptosis. El análisis de este mecanismo mostró una reducción de la expresión de un subconjunto de proteínas anti-apoptóticas, incluyendo: BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB en células tratadas con AA. El AA también disminuyó significativamente la expresión y actividad promotora de estas moléculas. Además, se demostró que la regulación negativa del factor de transcripción oncogénico GLI1 es el mecanismo subyacente que controla la expresión de BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB. Empleando una combinación de ensayos de luciferasa, inmunoprecipitación de la cromatina, y estudios de expresión, demostramos que GLI1 puede unirse al promotor de estas moléculas antiapoptóticas, aumentando su expresión y la actividad del promotor. Además la caracterización del efecto anti-tumoral del AA mostró que este PUFA regula la expresión de GLI1 a través de la modulación de su promotor mediante la vía de NFATc1 la cual silencia esta secuencia reguladora. Por último, observamos que la apoptosis inducida por AA es revertida con la sobre-expresión de GLI1 en estas células sensibles al AA. Se observó además que el AA regula al factor de transcripción GLI por modificaciones del metabolismo de los lípidos, dentro de las cuales el aumento de hidroperóxidos lipídicos no enzimáticos serían los responsables de la disminución de la actividad y la expresión GLI1. En conjunto, nuestros resultados definen un nuevo mecanismo molecular implicado en la biología tumoral, y en las funciones anti-tumorales del AA que podrían servir como base para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

SUMMARY

Epidemiological and experimental studies have demonstrated a role for Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their oxidative metabolite derivatives resulting, from enzymatic (LOXs and COXs) activities or non-enzymatic pathways, in different stages of tumor development. Both *in vitro* and *in vivo* studies have implicated the role of different fatty acids in tumor development and progression. In particular, the cytotoxic effects of PUFAs on different cancers have been established. Increased cellular levels of PUFAs have also been shown to inhibit tumor growth. PUFAs can also act as cytotoxic molecules, activating different cell signaling pathways that modulate proliferation, cell death and migration.

However, the molecular mechanisms underlying this phenomenon remain elusive. Here, we provide evidence supporting the anti-tumoral effects of the PUFA AA. *In vitro* and *in vivo* experiments showed that AA treatment decreases tumor growth and metastasis, and increases apoptosis. Analysis of the mechanism for these actions showed a reduced expression of a subset of anti-apoptotic proteins, including BCL-2, BFL-1/A1 and 4-1BB in AA-treated cells. AA significantly diminished the expression and promoter activity of these molecules. We further demonstrate that AA downregulate the activity and expression of the oncogenic transcription factor GLI1. Moreover, we provide evidence that the AA-induced apoptosis can be rescued by the re-expression of GLI1 in AA-sensitive cells. Then, using a combination of luciferase reporter, chromatin immunoprecipitation, and expression studies, we showed that GLI1 can bind to the promoter of these antiapoptotic molecules, increasing their expression and promoter activity. So we showed that the downregulation of GLI1 is the underlying mechanism controlling the expression of BCL-2, BFL-1/A1 and 4-1BB. Further characterization of the AA anti-tumoral effect pointed out that this PUFA regulates GLI1 expression through the modulation of its promoter via NFAT1-mediated silencing of this regulatory sequence. Additionally, in relation with the nature of the signal of the transcription regulation effect observed, we observed that AA regulates the GLI1 transcription factor by modifications of the lipids metabolism, including the non enzymatic lipids peroxidation by increasing the oxidative cell stress, which in turns may diminish the GLI1 activity and expression. Collectively, our results define a novel mechanism underlying AA anti-tumoral functions which may be useful as the starting point for the development of new AA-based therapeutic approaches.

I- INTRODUCCIÓN

I-1 ANTECEDENTES

I-1.1 CÁNCER: INCIDENCIA Y MORTALIDAD

Datos epidemiológicos muestran que en el mundo anualmente a 11 millones de personas se les diagnostica un cáncer (excluyendo el cáncer de piel) y cerca de 7 millones de pacientes mueren por esta patología.

Particularmente, el cáncer de mama es la segunda causa más común de cáncer, con una incidencia del 11% según estudios del 2008 (1). El cáncer de mama a nivel mundial es el cáncer más frecuente en mujeres (23% en 2008) y la causa más común de muerte por cáncer en mujeres de todo el mundo. Por otra parte, el cáncer de páncreas presenta un porcentaje bajo de incidencia de alrededor del 2% en relación a los nuevos casos de cáncer, sin embargo sigue siendo uno de los cánceres de mayor letalidad por la pobre sobrevida respecto a su diagnóstico. Debido a que con frecuencia es diagnosticado en un estadio avanzado, el cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer en adultos de los países del oeste, con un índice de supervivencia bajo (4% en 5 años) en comparación con otros cánceres (1-4).

En Argentina, como en otros países el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, con tasas comparables a las de Canadá y los EE.UU. Así mismo, existe en Argentina una variabilidad substancial entre las distintas regiones del país y la incidencia y tipo de cáncer. Específicamente, los estudios epidemiológicos en la provincia de Córdoba, mostraron que en conjunto, el cáncer de mama, próstata y pulmón son los principales tipos de cáncer (5). El cáncer de páncreas presenta al igual que a nivel mundial una baja incidencia entre los cánceres, siendo mayor en hombres que en mujeres (5-7).

Las tasas de cáncer están aumentando anualmente debido al incremento de la población, diagnósticos precoces y la exposición a mayores factores de riesgo (4). Las diferentes variedades de cánceres parecen estar relacionadas a diferentes factores de riesgo y las poblaciones, con hábitos y entornos diversos, se ven por lo tanto afectadas por diferentes cánceres, en proporción acorde a factores a los cuales estén expuestas (1-3).

I-1.2 BIOLOGÍA CELULAR Y MECANISMOS MOLECULARES DEL CÁNCER: INICIO Y PROGRESIÓN

En el contexto de la biología celular del cáncer, se acepta que uno de los ejes del proceso neoplásico es que las células cancerígenas dejan de cumplir las reglas básicas del comportamiento social celular por las cuales mantienen su homeostasis los organismos multicelulares (8).

El modelo actual de cáncer explica que este se origina por una sola célula que ha experimentado una mutación somática inicial la cual se transmite a sus descendientes (cambios heredables). A su vez la progenie de estas células acumula mutaciones adicionales a través del tiempo, que conjuntamente con ventajas en la competencia celular y la selección natural en desmedro de la población de células somáticas normales determinan una población numerosa de células cancerosas. Estos cambios pueden ser mutaciones (alteraciones en la secuencia del ADN) o también cambios epigenéticos (modificaciones persistentes en el patrón de expresión de genes sin cambios en la secuencia del ADN), que le da a la célula una ventaja selectiva sobre sus células vecinas (9).

Además, por su inestabilidad genética, las células cancerígenas acumulan perturbaciones genéticas o epigenéticas a una tasa elevada. La inestabilidad genética es el resultado de mutaciones que interfieren sobre la replicación precisa del genoma y en consecuencia aumentan la tasa de alteraciones, disminuye la eficacia de reparación del ADN o aumentan los cortes y reordenamientos en los cromosomas que producen cariotipos anormales e inestables (10).

Así entonces, la acumulación de estas modificaciones lleva a defectos en el control normal tanto de la división celular, la diferenciación y la apoptosis contribuyendo al desarrollo y progresión del cáncer (8).

Una de las características más importantes de las células cancerígenas es su capacidad de proliferar de manera descontrolada, debido a una desregulación en la inducción y producción de señales que promueven el crecimiento de la célula y la división celular. Sumado a esto, la célula cancerígena es capaz de evadir las señales que limitan e inhiben la proliferación celular. Además, a diferencia de las células normales, las células cancerígenas son menos sensible a estímulos que provoquen muerte celular, permitiendo

de esta forma una mayor sobrevida celular que las convierte en células inmortales con un potencial replicativo ilimitado. En relación a lo previamente descrito, las células cancerígenas poseen diversas características distintivas. Entre ellas la capacidad de reprogramación del metabolismo energético así como la capacidad de evadir la detección y destrucción por parte del sistema inmune son cualidades que permiten la formación y progresión de los tumores. Por otra parte, es importante destacar que en algunos casos se observó que la inflamación juega un rol fundamental en estadios incipientes y avanzados de la progresión neoplásica, capaz de promover y potenciar su desarrollo (8, 10) (Figura I-1).

Por otra parte, así como en los tejidos normales, los tumores requieren una adecuada irrigación sanguínea que le provea de oxígeno y nutrientes, ante lo cual las células tumorales adquieren la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso denominado angiogénesis. Esta inducción de la angiogenesis permanece activa de manera continua en los tumores lo que favorece y ayuda su crecimiento sostenido. Además se conoce que este proceso de neoformación vascular contribuye a la progresión neoplásica en fases microscópicas premalignas y no solamente en estados avanzados como había sido antes demostrado (Figura I-1).

Durante la progresión tumoral hacia un grado patológico de malignidad mayor, se produce la invasión de otros tejidos y formación de tumores secundarios en otra parte del cuerpo, proceso denominado metástasis y hecho cardinal del cáncer. Esta es una característica esencial de la célula cancerígena, que se ve favorecida por alteraciones de la forma celular y la pérdida de contacto y adhesión con sus células vecinas y a la matriz extracelular. Este proceso de invasión y metástasis se produce a través de una secuencia discreta de etapas que la célula cancerígena debe afrontar. En primer lugar las células de un tumor benigno localizado adquieren la capacidad de emigrar y abandonar el tumor de origen atravesando la lámina basal del tejido, luego éstas deben ingresar a los vasos sanguíneos y linfáticos más cercanos, circular por el sistema circulatorio, seguido por la capacidad de extravasar los vasos hacia el parenquima de tejidos distantes y formar en estos sitios focos metastásicos. El éxito de la colonización en esta última etapa depende de la adaptación de las células al microambiente del tejido, ya que solo unas pocas células cancerosas que alcanzan el torrente circulatorio pueden sobrevivir y originar un tumor en otro sitio (8,10) (Figura I-1).

La progresión tumoral involucra una acumulación de alteraciones celulares y cambios que surgen también en el ambiente extracelular, en los cuales están implicados múltiples mecanismos de regulación que controlan el comportamiento celular.

Se ha estudiado que las mutaciones somáticas en el cáncer se producen en genes específicos cuya alteración frecuentemente contribuye al proceso cancerígeno. Dentro de estos genes los denominados “Protooncogenes”, pueden mutar y ser sobreexpresados o sobreactivarse, convirtiéndose en “Oncogenes”. A su vez, existen genes que pierden su función debido a una mutación, estos son llamados “Genes supresores de tumores” y un tercer grupo cuyo cambio conduce a una marcada inestabilidad genética se conocen como “Genes de mantenimiento del ADN” (8).

Además, de estas modificaciones genéticas asociadas al desarrollo y progresión del cáncer, algunos oncogenes y genes supresores de tumores presentan una expresión y función alterada causada por cambios epigenéticos, mecanismos heredables por lo cual se controlan la expresión de estos genes sin modificaciones a nivel génico. Una característica importante de las bases heredables de los mecanismos epigenéticos es su reversibilidad y dinámica a diferencia de la estabilidad que presentan las alteraciones a nivel del ADN. (8,11).

Los mecanismos epigenéticos que influyen en la expresión de genes que mejor se comprenden hasta el momento, consisten en modificaciones químicas del ADN, modificaciones de histonas y microARNs. Estas modificaciones epigenéticas inducen o reprimen la expresión de genes modificando el fenotipo celular, por lo que la desregulación de estos mecanismos epigenéticos puede conducir al desarrollo tumoral.

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados en regulación transcripcional, la cual es asociada frecuentemente al silenciamiento de la expresión génica. Por ejemplo en el adenocarcinoma pancreático ductal la metilación del ADN es un mecanismo de inactivación de genes supresores de tumores, entre ellos el gen de p16. La proteína p16 inhibe la unión de las Ciclinas D a sus ciclinas dependientes de kinasas (CDK), la pérdida de p16 incrementa la fosforilación de la proteína retinoblastoma y produce la activación del ciclo celular. Como resultado esta modificación epigenética impide la unión de factores de transcripción, tales como SP1, y simultáneamente atrae a proteínas de unión a regiones CpG metiladas (MBD) que pueden a su vez reclutar otras proteínas como las Proteínas deacetilas de Histonas (HDAC) y conducir así a la

compactación de la cromatina y al silenciamiento génico. A su vez en el cáncer la metilación del ADN actúa conjuntamente con otras modificaciones epigenéticas como la modificación de histonas.

En este contexto, las colas de las histonas H3 y H4 nucleosomales contienen diferentes residuos como serinas (S), lisinas (Y), treoninas (T), lisinas (K) y argininas (R) que están sujetos a una variedad de modificaciones post-traduccionales incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, y ubiquitinación. Estas modificaciones participan en la estabilidad y movilidad de las histonas lo que contribuye en gran medida al fenotipo de la célula cancerígena (14).

Las modificaciones en las histonas se conocen como "marcas" y existe además un código de histonas el cual utiliza el tipo, localización y combinación de estas marcas en las histonas que predice si un gen puede ser silenciado o expresado según este conjunto de circunstancias particulares. No solo se incluye en este código de histonas las marcas sino también las proteínas que adicionan la marca, conocidos como "Writers", las proteínas que leen estas marcas, conocidos como "Readers" y aquellas proteínas que eliminan las marcas, los "Erasers". Cada uno de estos jugadores coordina todos los aspectos del código de histonas y contribuyen a una propiedad dinámica en la regulación de histonas (14).

En el caso de la acetilación de histonas, este proceso ocurre vía Acetiltransferasas de Histonas (HATs), como la proteína de unión a SREB (CBP), p300 y el factor asociado p300/CBP (P/CAF), que resulta en una activación de la expresión de genes y se asocia también a una cromatina menos compactada. Por el contrario, la desacetilación de histonas está mediada por Desacetilasas de Histonas (HDACs) que induce el silenciamiento de genes y se asocia a una cromatina más compactada. En conjunto estas enzimas proveen un mecanismo finamente controlado y dinámico que frente a la presencia de alteraciones pueden activar vías oncogénicas y silenciar vías supresoras de tumores (14-15).

Así mismo, las posiciones de los nucleosomas en relación con la hebra de ADN también influyen en la transcripción de genes y están regulados por complejos de remodelación de la cromatina, como los complejos SWI / SNF.

Por su parte, en un contexto más amplio estas modificaciones epigenéticas tienen un papel fundamental en el efecto de los factores microambientales y macroambientales como moduladores de la expresión génica (12-15).

Las bases moleculares del comportamiento de la célula cancerosa asientan en forma combinada y dinámica en estos cambios genéticos y epigenéticos de genes críticos en la historia natural de cada cáncer, que actúan en diferentes vías bioquímicas y regulatorias. La mayoría de los componentes de estas vías, cumplen su rol durante el desarrollo embrionario y/o operan en el cuerpo adulto normal manteniendo la homeostasis, sin embargo en las células cancerígenas estas complejas vías se ven alteradas en distintos niveles (11).

Comprender la biología de las células cancerosas y los mecanismos que determinan el crecimiento y la diseminación del tumor es fundamental para el tratamiento y prevención del cáncer.

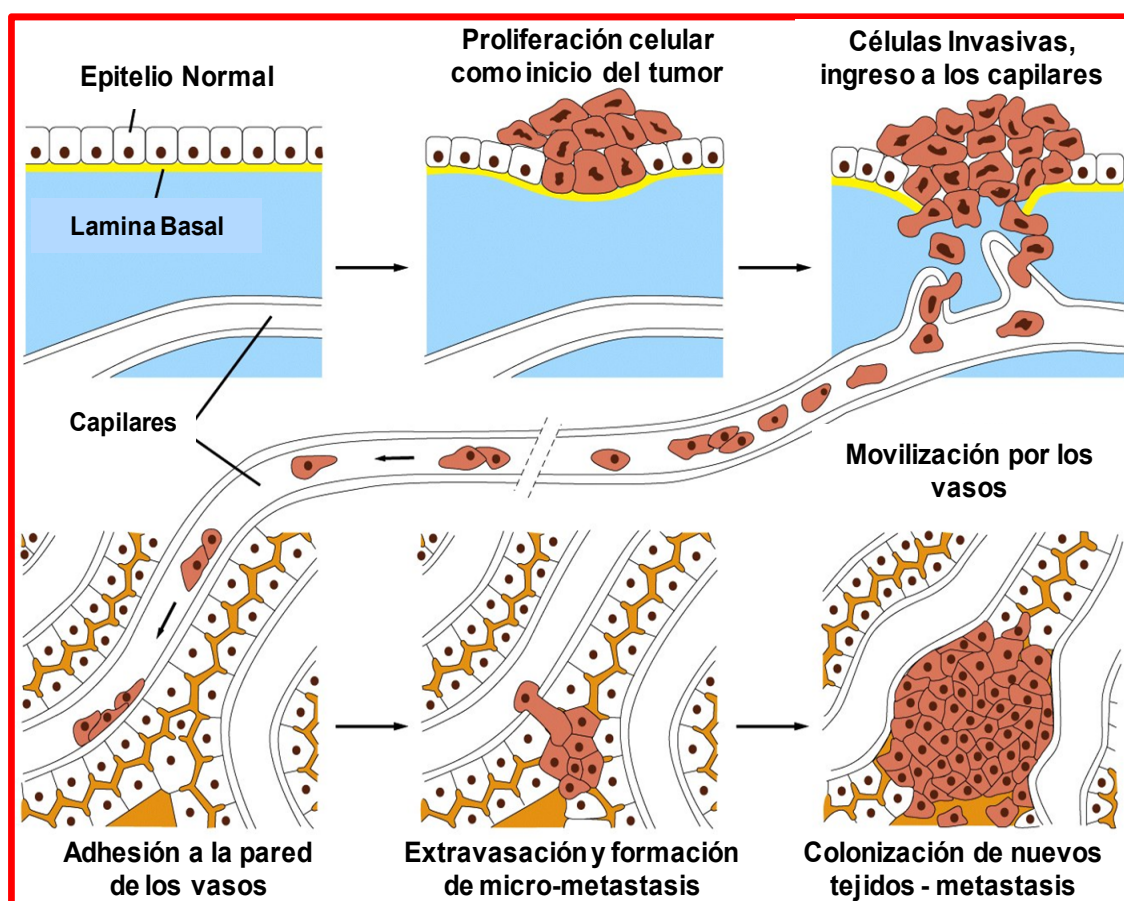


Figura I-1: Inicio y progresión del cáncer. (Imagen obtenida de *Molecular Biology of the Cell* © Garland Science 2008).

I-1.3 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER

Como describimos anteriormente, el desarrollo del cáncer generalmente requiere numerosas etapas, las cuales están reguladas por múltiples factores, entre ellos la constitución genética del individuo y las interacciones dinámicas entre los genes específicos y los factores ambientales. Los factores individuales interactúan unos con otros aumentando o disminuyendo el riesgo de cáncer, o son modificadores o precursores de otros, actuando en conjunto para multiplicar el efecto (8, 16).

Entre los factores genéticos asociados al cáncer, solo del 5% al 10%, están asociados a mutaciones hereditarias en la línea germinal. Los individuos con estas mutaciones poseen un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer incluso a edades tempranas. En esto se incluyen por ejemplo, mutaciones en genes supresores de tumores que conllevan a retinoblastomas, síndrome de Li Fraumeni, neoplasia endocrina de Tipo I o mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 que aumentan la susceptibilidad al cáncer de mama.

Por otro lado, numerosos factores ambientales son causantes o moduladores del proceso cancerígeno, estos incluyen al tabaco, agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos, los químicos industriales que persisten en el ambiente y se acumulan en el agua o en los alimentos, los agentes mutagénicos físicos como las distintas radiaciones UV, ionizantes, rayos δ o α , o tratamientos prolongados con hormonas o medicamentos entre otros, pueden ser factores causantes, que pueden inducir cambios en el ADN, causar inflamación crónica y contribuir al desarrollo tumoral (4).

Los componentes nutricionales por su parte son uno de los factores ambientales claves en la modulación, actuando tanto en la prevención como en la inducción del proceso cancerígeno. Así, la carencia de nutrientes esenciales (17), altos contenidos calóricos y saturados de grasas, bajo contenido de fibras se ha asociado con el riesgo de desarrollo neoplásico (18).

En relación a esto, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales muestran una estrecha relación entre los nutrientes y el desarrollo y progresión del cáncer, sin embargo aún no se conoce totalmente su efecto en esta enfermedad (19, 20).

En este contexto se ha comenzado a estudiar los efectos de los compuestos nutricionales bioactivos, los cuales se conoce que inducen modificaciones en el microambiente de los tejidos, en el flujo de la información genética en múltiples sitios de

regulación; a través de cambios en la estabilidad genómica, daños a nivel molecular del ADN o alteraciones epigenéticas que llevan a perturbaciones a nivel transcripcional en la expresión de los distintos ARN o a nivel traduccional en la expresión de proteínas que llevan a la pérdida de la función celular y homeostasis de los tejidos (4, 21, 22) (Figura I-2).

Así, un consistente cúmulo de datos epidemiológicos y experimentales nuestros y de otros laboratorios han demostrado que entre los diferentes nutrientes, aquellos relacionados con el metabolismo lipídico, particularmente el de los AGs y sus derivados bioactivos surgidos de la actividad de las enzimas COXs, LOXs y P450 son moduladores del proceso cancerígeno y capaces de modificar las diferentes etapas de esta enfermedad (19, 23, 24).

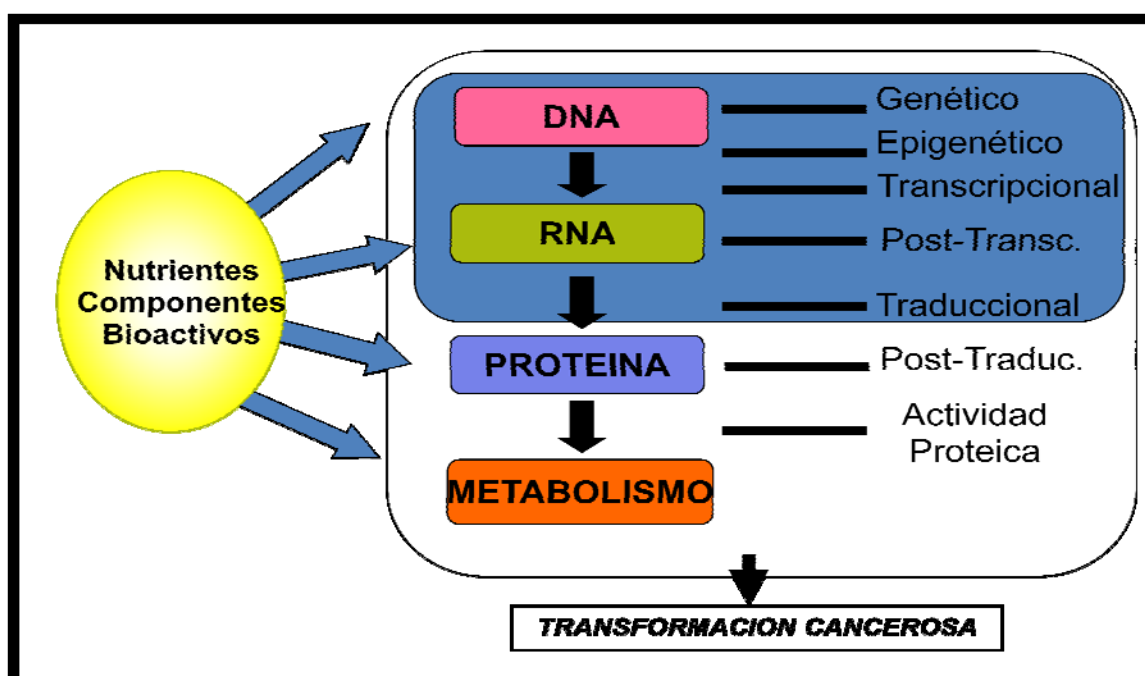


Figura I-2: Mecanismos de acción de los micro y macro nutrientes como componentes bioactivos en diferentes niveles de regulación con posible efecto en células cancerígenas. (Imagen adaptada de World Cancer Research Fund (WCRF), 2007).

I-1.4. METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Para comprender las funciones de los lípidos como moduladores del proceso carcinogénico, es importante exponer algunas generalidades acerca del metabolismo lipídico.

En el metabolismo lipídico están involucrados lípidos exógenos obtenidos a través de la dieta y lípidos endógenos sintetizados *de novo* en el cuerpo.

Los ácidos grasos (AGs) son moléculas lineales formadas por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro siendo los componentes fundamentales de casi todos los lípidos. La proporción de estos compuestos en estado libre es reducida, ya que la mayor parte de los AGs establecen uniones de tipo ester con un grupo alcohol, para formar triacilgliceroles y fosfolípidos, entre otros lípidos.

Los AGs exógenos requieren que su transporte a través de las membranas de las diferentes células de los tejidos se produzca a través de mecanismos específicos que permitan una distribución rápida y controlada. De este modo su incorporación a las células puede ser regulada acorde a las necesidades metabólicas y evitar posibles efectos dañinos debido al exceso en la acumulación de ácidos grasos. La incorporación celular de AGs puede darse por simple difusión a través de la membrana plasmática o a través de un conjunto específico de proteínas trans-membranosas selectivamente expresadas y reguladas. Estas proteínas implicadas en el transporte de AGs incluyen a los ácidos grasos traslocasas (FAT/CD36), proteínas transportadoras de AGs y proteínas de unión de ácidos grasos (25, 26). Otras evidencias sugieren además que no solo estas proteínas juegan un rol fundamental en el proceso de incorporación de lípidos sino que también los microdominios lipídicos de las membranas tienen una función importante en este proceso. En este contexto, ha sido demostrado que un incremento en la asociación entre los rafts membranosos y las proteínas FAT/CD36 llevan a un incremento en la incorporación de AGs por lo que la asociación dinámica entre estos componentes de membrana podría regular este proceso (27).

En las células, tanto los AGs endógenos como los exógenos son activados en primer lugar a acetil coenzima A (acetil-CoA) y luego, tras sucesivos pasos, son incorporados a los fosfolípidos de membrana.

La síntesis *de novo* de AGs comienza en el citosol con acetil-CoA originado a partir de la decarboxilación oxidativa del piruvato, β -oxidación de ácidos grasos o degradación de carbohidratos y proteínas. La síntesis de AGs es llevada a cabo por adición sucesiva de fragmentos de 2 carbonos (acetil-CoA) al extremo carboxilo del acilo en crecimiento. Así, la síntesis del AG saturado 16:0 - PA (ácido palmítico) comienza en el citosol y es catalizada por la enzima ácido graso sintetasa (AGS). Luego la elongación y desaturación de la cadena ocurre en la membrana del retículo endoplásmico liso. De este modo, el 16:0 es elongado para formar 18:0 - SA, (ácido esteárico). Además, la introducción de un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena carbonada por actividad de la enzima Δ -9 desaturasa transforma el 16:0 en 16:1-PA- ω -7, (ácido palmitoleico) y el 18:0 en 18:1-OA- ω -9, (ácido oleico). Los ácidos grasos que no poseen dobles ligaduras en sus cadenas carbonadas se denominan “Saturados”, mientras que aquellos que sí poseen dobles enlaces son ácidos grasos “Insaturados”, siendo monoinsaturados (MUFAs) aquellos con una ligadura y poliinsaturados (PUFAs) aquellos con dos o más dobles ligaduras (28) (Figura I-3).

Los PUFAs pueden clasificarse además en al menos cuatro familias, dependiendo del ácido graso precursor a partir del cual son sintetizados: la serie ω -7 deriva del PA, la serie ω -9 deriva del OA, la serie ω -6 deriva del ácido linoleico (18:2-LA- ω -6) y la serie ω -3 del ácido α -linolénico (18:3-ALA- ω -3). En los mamíferos, los ácidos grasos LA y ALA, son llamados “Ácidos Grasos Esenciales” (EFAs) ya que son requeridos para la supervivencia pues no pueden ser sintetizados *de novo*, sino que deben ser incorporados con la dieta para que puedan ser sintetizados sus metabolitos de las series ω -3 y ω -6 de PUFAs y sus otros derivados bioactivos. Esto se debe, a que a diferencia de las plantas, los mamíferos perdieron evolutivamente la enzima Δ -12 desaturasa que les permite insertar dobles enlaces entre los carbonos 12 y 13 para convertir el OA ω -9 en LA ω -6; además de la enzima Δ -15 desaturasa que insatura a nivel del carbono 15 y 16 para convertir LA ω -6 en ALA ω -3. Las células de mamíferos metabolizan a los EFAs por sucesivas reacciones de elongación y desaturación en las cuales están implicadas el mismo set de enzimas, las elongasas y las enzimas Δ -5 y Δ -6 desaturasas que metabolizan las diferentes familias de ácidos grasos (ω -7, ω -9, ω -6 y ω -3) (29) (Figura I-3).

Para su síntesis las moléculas de PUFAs compiten por lo tanto unos con otros por las mismas enzimas las cuales tienen una preferencia jerárquica entre los ácidos grasos del

siguiente orden, ω -3 > ω -6 > ω -9 > ω -7. Esta preferencia por los PUFAs de 20 carbonos con mayor grado de insaturación tiene grandes implicancias para los hábitos dietarios y el metabolismo. Por lo tanto, si en condiciones de alimentación comunes a nuestras culturas alimentarias los derivados de ω -9 se forman en pequeñas cantidades, el incremento en el ácido graso 20:3 ω -9, un metabolito del OA, sugiere una deficiencia en ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6 (19, 30).

Existen controversias en relación a los últimos pasos de la síntesis de ácidos grasos, en particular sobre la elongación y desaturación del ácido araquidónico (AA-20:4- ω -6) y el ácido eicosapentanoico (EPA-20:5- ω -3). Ha sido aceptado desde hace tiempo que el AA y el EPA son primero elongados y luego desaturados por una enzima denominada Δ -4 desaturasa formando el ácido graso 22:5- ω -6 y el ácido docosaexanoico (22:6-DHA- ω -3) respectivamente. Además ha sido propuesta una nueva vía alternativa que involucra al peroxisoma, conocida como vía de Sprecher (31). Esta vía implica una elongación secuencial del AA y EPA hacia cadenas de 24 carbonos seguido por una segunda Δ -6 desaturación hacia 24:5- ω -6 y 24:6- ω -3, los cuales pasan finalmente por un proceso de β -oxidación en el peroxisoma que sintetiza 22:5- ω -6 y DHA- ω -3. La literatura actual sugiere que ambas vías, la del mecanismo directo por elongación de la Δ -4 desaturasa y la vía de Sprecher estarían implicadas en la biosíntesis de PUFAs de cadenas largas (Figura I-3), (31, 32).

Por lo tanto, las diferentes familias de ácidos grasos difieren en su estructura, incluyendo cantidad de carbonos en la cadena acilada y la presencia y número de dobles ligaduras. Como se dijo previamente, hay dos familias de PUFAs que no pueden ser sintetizadas de novo siendo denominados los ácidos grasos EFAs los cuales deben ser estrictamente incorporados con la dieta para asegurar la supervivencia del organismo.

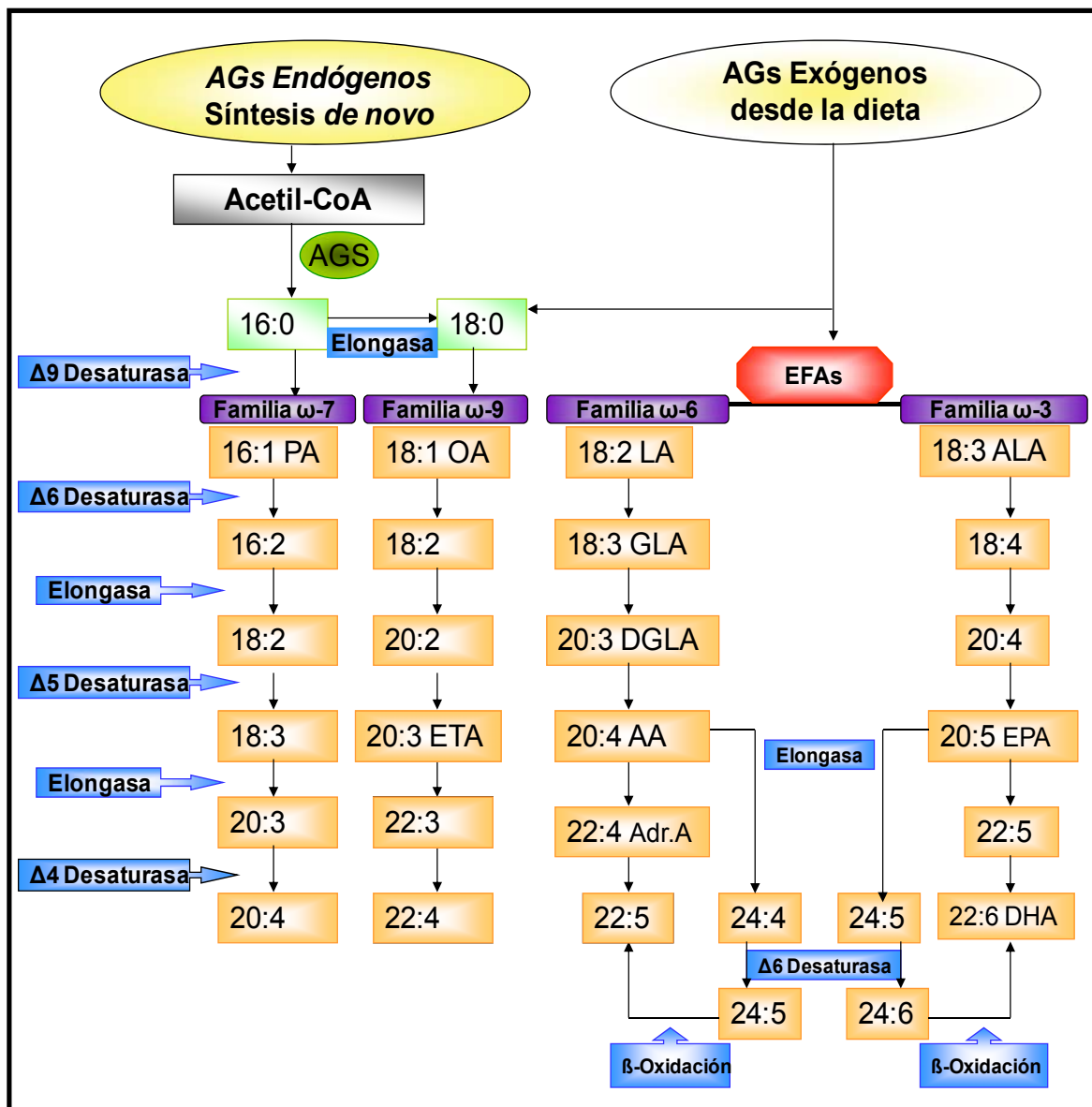


Figura I-3: Biosíntesis de Ácidos Grasos (Imagen de Comba A. et al – Cancer Met. Review 2011).

I-1.5. ÁCIDOS GRASOS Y SUS METABOLITOS DERIVADOS: OXIDACIÓN ENZIMÁTICA Y NO ENZIMÁTICA

Los PUFAs, además de ser componentes esenciales de las bicapas de las membranas biológicas, se sabe que por su estructura química, tienen alta reactividad con moléculas de oxígeno y esto va a depender del número y la posición de sus dobles enlaces. La oxidación de AGs puede suceder de manera no enzimática, lo que contribuye al estrés oxidativo celular, o bien por la acción de diferentes oxigenasas. En la oxidación lipídica no enzimática la pérdida de un átomo de hidrógeno puede ocurrir en cualquier punto de la cadena y el número de dobles ligaduras determina el grado de oxidación. Esta reacción se inicia por la captura de un átomo de hidrógeno desde el grupo metileno, la cual se ve facilitada debido a la presencia de dobles ligaduras en sus cadenas carbonadas. Cuando el átomo de hidrógeno se pierde, este carbono se convierte en un radical libre el cual reacciona con una molécula de oxígeno para formar radical peroxilo. Estos son capaces de sustraer un átomo de hidrogeno de otro AG para formar un hidroperóxido lipídico el cual puede reaccionar nuevamente con una molécula de oxígeno y así sucesivamente propagar estas reacciones (33, 34) (Figura I-4). Por otra parte, además de la oxidación no enzimática la oxigenación enzimática de los PUFAs de 20 carbonos, en particular de los EFAs, genera una serie de metabolitos bioactivos conocidos en general como eicosanoides (35, 36). Como se muestra en la Figura I-5, los eicosanoides pertenecen a una familia de mediadores biolipídicos que derivan de la oxigenación de PUFAs de 20 carbonos por la acción de las enzimas Lipoxigenasas (LOXs), Cicloxigenasas (COXs) y Epoxigenasas (p450) las cuales catalizan de manera específica y controlada la incorporación de oxígeno molecular en moléculas de ácidos grasos libres o esterificados para la formación de hidroperóxidos (37). Todos estos derivados lipídicos son metabolitos de muy corta duración, los cuales se producen localmente en el momento en que se necesitan y son importante derivados lipídicos bioactivos que ejercen su actividad biológica a muy bajas concentraciones y casi instantáneamente se destruyen (24). La actividad enzimática de las LOXs forma leucotrienos (LT), lipoxinas (LXS), hepoxilinas (HXS), ácidos dihydroyeicosatrienoic (DiHETEs), y ácidos hidroxieicosatetraenoico (HETEs). Por otra parte, la actividad enzimática de las COXs genera principalmente prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TXS). Además, se forman eicosanoides por actividad de la enzima citocromo p450 que

metaboliza el AA para formar PGs, ácidos epoxyeicosatrienoicos (EET), y HETEs, entre otros (38-40).

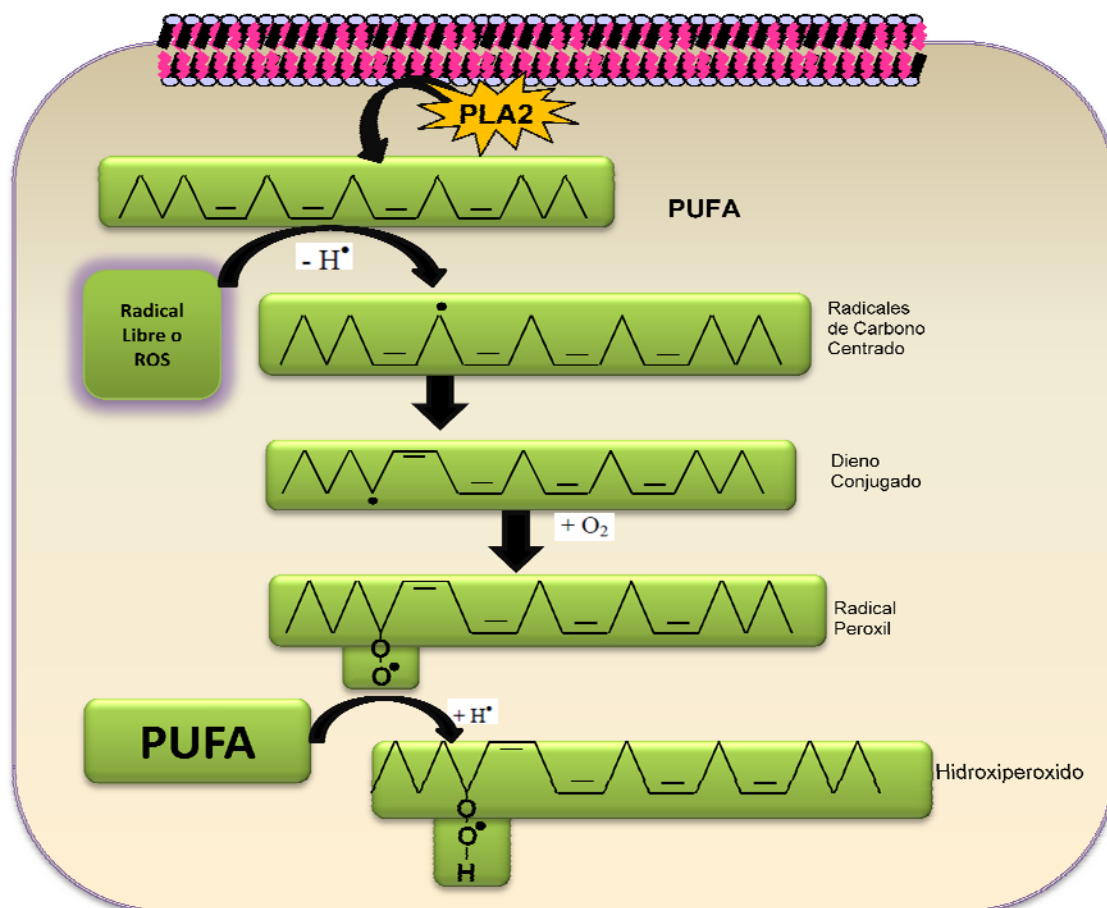


Figura I-4: Oxidación no enzimática de ácidos grasos poliinsaturados. (Imagen adaptada de Gutteridge JM. Clin Chem 1995).

El AA, es el principal precursor de eicosanoides de la serie 2 y serie 4, los cuales tienen funciones biológicas más potentes que los liberados a partir de dihomo- γ -linolénico (DGLA- ω -3) o eicosapentaenoico ácido (EPA- ω -3) de la serie 1 y la serie 3 y 5 respectivamente. Éste puede ser sintetizado en las células a partir del EFA (LA) incorporado con la dieta, o bien ser suministrado exogenamente directamente a los tejidos. El AA es un PUFA que se encuentra en proporción relativamente baja en las membranas de las células, se encuentra unido en posición sn-2 de diversos glicerofosfolípidos de membrana de los cuales se libera al citosol por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), o

desde el fosfatidilinositol-4 ,5-bifosfato por la acción de la fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol lipasa (DAGL) (41).

EL AA- ω -6 es el precursor de la serie 2 de PGs, TXS y 12 - HHT y la serie 4 de LTs, LXS, HXS, DiHETEs, HETE y EETs (42) (Figura I-5). Asimismo otros AGs son precursores de eicosanoides. Así, el LA- ω -6 es el precursor de ácidos hydroxyoctadecadienoic (HODEs). El DGLA- ω -6 es el precursor de la serie 1 de PGs y TXS (Fig. 2). El EPA forma la serie 3 de PGs y TXS y la serie 5 de LT, LXS, y los ácidos hydroxyeicosapentaenoic (HEPES), así como la serie E de nuevos compuestos conocidos como resolvinas (43-45). El ácido docosahexaenoico (DHA) es un precursor de la resolvinas de la serie D y de otras resolvinas y diversos componentes bioactivos con estructura de trieno conjugado denominadas neuroprotectinas (46) (Figura I-5). Como dijimos anteriormente estas enzimas catalizan la oxigenación de PUFAs a sus hidroperóxidos lipídicos correspondiente de manera específica. Las enzimas lipoxigenasas (LOXs) se clasifican en distintas subfamilias en relación a su especificidad en la posición en la cual incorporan la molécula de oxígeno en la cadena de AG. Particularmente en los mamíferos encontramos: 5- , 8- , 12- y 15-LOX (47). Los principales productos son en primer lugar los Ácidos 5-, 8-, 12- y 15- hydroxyperoxyeicosatetraenoicos (5-, 8-, 12- y 15-HPETE), respectivamente, que se reducen rápidamente por acción de la glutatión peroxidasa a sus correspondientes hidroxilos derivados más estables y por ende, posibles de ser medidos experimentalmente: los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs), leucotrienos (LTs), y lipoxinas (48). Además, la enzima 15-LOX puede ser subdividida en dos isoformas, llamadas 15-LOX-1 y 15-LOX-2. En cuanto a las características enzimáticas, 15-LOX-1 preferentemente metaboliza el LA para formar ácido hidroxi-octadecadienoico (HODE), particularmente el 13-HODE, pero también metaboliza al AA a 15-HETE, mientras que ocurre preferencialmente lo contrario para 15-LOX-2 (49).

La biosíntesis de los compuestos derivados de estas enzimas es delicadamente regulado por diferentes mecanismos homeostáticos, entre ellos el cambio en los niveles de expresión de la enzima, en su actividad enzimática y en la localización subcelular de la proteína así como también en la función de las proteínas de transporte necesarias para su exportación (50).

Al mismo tiempo, cuando PLA₂ cataliza la hidrólisis de AGs en la posición 2 de glicerol, se generan además una variedad de compuestos denominados lisofosfolípidos De

variadas acciones biológicas (40) (Fig I-5). Además, existen otros eicosanoides derivados de la oxidación de PUFAs denominados endocannabinoides (ECBS). Estos son lípidos endógenos derivados principalmente del AA que se producen en el cerebro y otros los tejidos y están implicados también al igual que los AGs en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el cáncer (51). Para todos estos procesos metabólicos las células pueden utilizar AGs libres tomados de la matriz extracelular o AGs esterificados liberados de fosfolípidos de membrana por la PLA₂. Por ejemplo, los estudios en condiciones fisiológicas de plaquetas sobre la utilización relativa de AA esterificado endógeno versus exógeno han mostrado que los AGs endógenos son utilizados para la producción de tromboxano, pero los exógenos del plasma se utilizan preferentemente para la producción de 12-HETE por 12-LOX (52, 53). Esta diferencia puede deberse a la eficacia de acoplamiento del AA exógeno versus el endógeno frente a las enzimas dependiendo de su localización subcelular (54).

En conclusión, hemos aportado evidencias epidemiológicas y experimentales indicativas de que ciertos AGs como los PUFAs y sus vías metabólicas orientadas a la formación de compuestos lipídicos bioactivos modulan una gran variedad de procesos metabólicos fisiológicos y patológicos, tanto de las células normales como neoplásicas, que a continuación abordaremos.

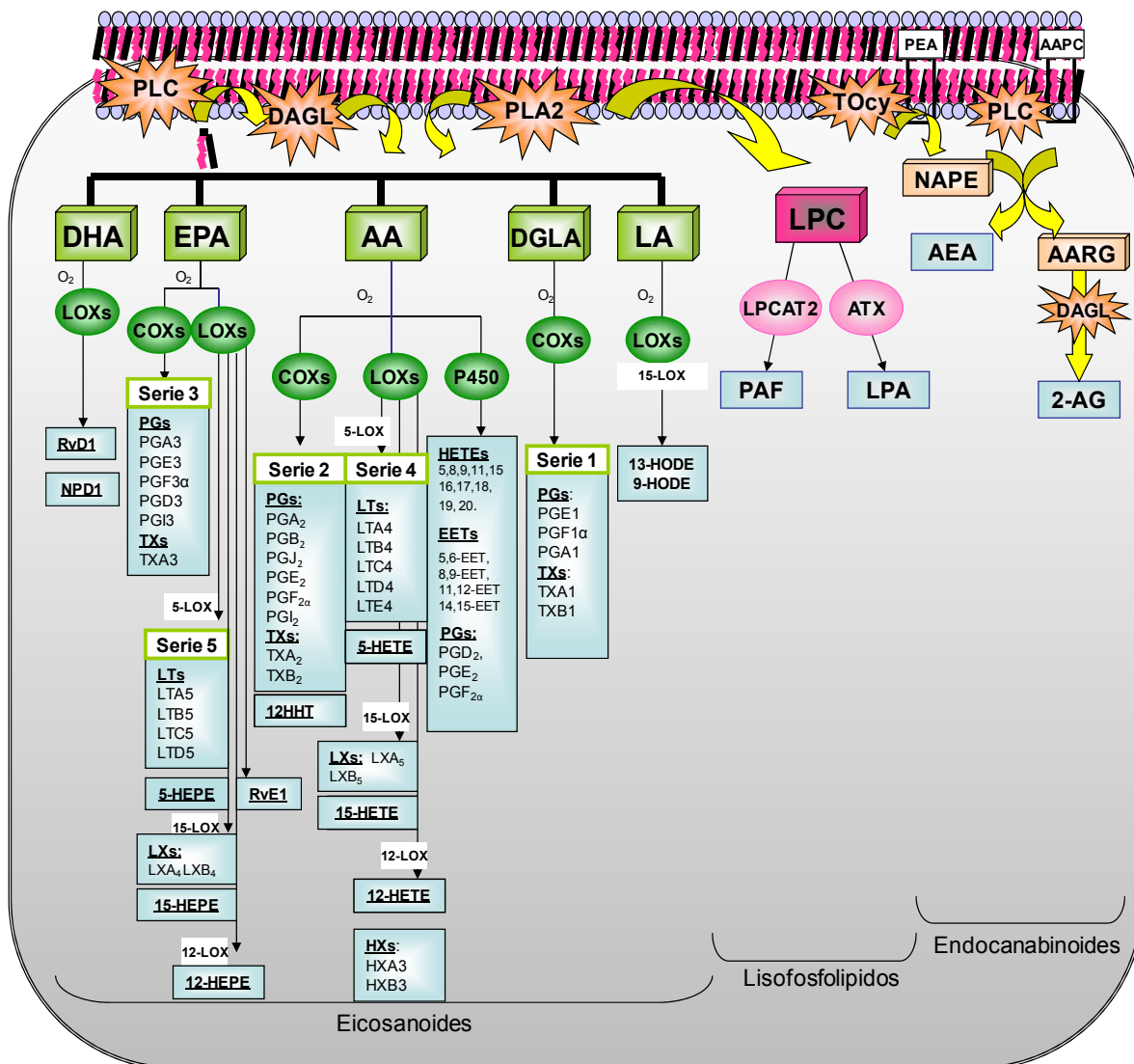


Figura I.5: Oxidación enzimática de ácidos grasos y sus metabolitos derivados. (Imagen de Comba A. et al – Cancer Met. Review 2011).

I-1.6. PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS NORMALES Y TUMORALES

Los AGs tanto endógenos como los exógenos son incorporados en los fosfolípidos de las membranas celulares y desempeñan importantes funciones como componente de las mismas, hecho que condiciona numerosos mecanismos celulares y moleculares y la actividad de proteínas transmembrana e intracelular. Los cambios en la composición de los lípidos alteran las propiedades físicas de la bicapa lipídica, regulando a su vez una amplia gama de funciones de las proteínas de membrana, con diversa especificidad (43, 55). En efecto, muchas proteínas requieren de lípidos específicos, que le proporcionan un microambiente adecuado alrededor de la región hidrofóbica para su correcto funcionamiento (56). En este contexto, se ha demostrado, que una serie de enzimas de membrana, transportadores y receptores son particularmente sensibles al ambiente de AGs en el cual están insertos; entre ellos la adenilato ciclasa, la 5'-nucleotidasa, la Na⁺ / K⁺ ATPasa y el receptor de la insulina (57, 58). Así mismo, se ha estudiado que ciertos AGs saturados, como el mirístico (14:00) y el PA son los lípidos predominantes que se encuentran unido a las proteínas en células eucariotas. Ambos AGs están unidos a distintas clases de proteínas, algunas de las cuales están implicadas en la transducción de señales, tales como quinasas de la familia Src, Proteínas G, los receptores del factor de crecimiento, la proteína quinasa activada mitogénica (MAPK), la proteína kinasa C (PKC), y un número de moléculas sintetizadas por actividad de oncogenes (59). Estas proteínas son dirigidas a insertarse en regiones específicas de la membrana plasmática los Lipids Raft, que actúan como plataformas de señales para diversos componentes de señalización (60). Particularmente, estos microdominios son ricos en esfingolípidos y colesterol, y las cadenas de AGs de esos lípidos son más saturadas y tienden a estar fuertemente empaquetadas. La generación de señales intracelulares en respuesta a estímulos extracelulares parece estar modulada directa o indirectamente por estas regiones lipídicas en la regulación celular (25).

Ha sido estudiado que las perturbaciones en el metabolismo de los lípidos es un evento temprano y un elemento central en el proceso carcinogénico y precede con mucha antelación el diagnóstico de las neoplasia. Sin embargo, el perfil lipídico molecular preciso de las células tumorales no está aún del todo caracterizado debido a la gran variabilidad que le es propia a las células cancerosas. En relación a las características principales sobre

el perfil lipídico de una célula tumoral, se conoce que estas células sintetizan *de novo* grandes cantidades de AGs y colesterol, independientemente de los niveles de lípidos circulantes, y pueden beneficiarse con estos niveles en término de crecimiento, supervivencia y resistencia a los medicamentos antineoplásicos. Entre las alteraciones lipogénicas claves comunes de las células tumorales se encuentran, la sobre-expresión de la enzima ácido graso sintetasa y la desregulación de la proteína quinasa activada 5-AMP (61). También se ha observado que muchos tumores y líneas celulares cancerígenas son deficientes en las enzimas $\Delta 5$, $\Delta 6$ desaturasa y/o contienen bajos niveles de ácidos grasos esenciales derivados de estas enzimas. Esta pérdida de la capacidad de desaturación por las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ es relevante para el proceso de transformación neoplásica como lo demostraron Rodolfo R. Brenner y colaboradores en la década del '70 (62, 63).

Es importante destacar además, que la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos puede ser influenciada por diferentes factores; entre ellos las grasas saturadas, el colesterol, los AGs transformados en el procesamiento de aceites, el alcohol, la adrenalina y glucocorticoides entre otros, pues inhiben a las Δ -5 y Δ -6 desaturasas. Compuestos como el zinc, la piridoxina y el magnesio son necesarios para el correcto funcionamiento de estas enzimas (64). La remodelación de la composición de AGs de membrana puede alterar el metabolismo celular y afectar así las complejas cascadas de señalización que regulan las distintas respuestas fisiológicas. Los ácidos grasos funcionan entonces como moléculas de señalización que no sólo desencadenan una respuesta fisiológica, sino que también intervienen en la compleja red de señalización en cáncer (65).

Estudios recientes sobre el perfil lipídico de membranas llevadas a cabo en líneas celulares de cáncer gástrico han demostrado que la enzima esfingosina quinasa-1 (Sphk1) se encuentra sobreexpresada en esta línea y está vinculada al crecimiento tumoral y la transformación de las células provenientes de tumores de pacientes que enfrentan un pronóstico ominoso (66). Por otra parte, la determinación del perfil lipídico general de los fosfolípidos de membrana investigado, en 267 variedades de cáncer de mama humano, se correlacionó con altos niveles de AGs sintetizados *de novo*, siendo principalmente palmitato (16:0) unido a fosfatidilcolina, el más abundante hecho que torna las membranas menos fluido y más rígidas. A su vez, el aumento en la concentración de estos lípidos se asoció con la progresión del cáncer y con una mayor expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (67, 68). Cabe acotar que las acciones moduladoras

negativas/positivas son la base de la homeostasis celular y molecular en condiciones de normalidad, y de desbalance en la patología.

Por otra parte, diferentes evidencias apoyan el rol funcional de las enzimas involucradas en las vías metabólicas de los AGs, tales como las LOXs, las COXs y las enzimas P450 y sus metabolitos derivados como los eicosanoides, en la modulación del proceso carcinogénico. Su relación en la regulación de las diferentes etapas de la carcinogénesis viene siendo estudiada en nuestro laboratorio desde hace mucho tiempo (24, 30, 69). Así, ha sido demostrado que algunas células tumorales producen mayores cantidades de eicosanoides que sus homólogas normales, y aunque está ampliamente documentada la importancia de los eicosanoides en relación al cáncer, aun no se conocen bien la entidad y los mecanismos de acción en dicho proceso (70). Como dijimos, la síntesis de estas moléculas bioactivas depende del tipo celular, de la expresión de las enzimas y de la disponibilidad del ácido graso libre para el subsecuente metabolismo.

En relación a las enzimas LOXs y COXs, numerosos estudios clínicos basados en la expresión de estas enzimas, en tumores humanos, así como en modelos animales indican diferentes funciones en la carcinogénesis en relación a las diferentes isoformas. De hecho, diferentes LOXs presentan, actividad protumorigénica o antitumoral de manera tejido específico (71). Además, las vías de las enzimas LOXs y COXs están implicadas en la propagación y desarrollo de metástasis en diferentes tipos de cánceres, incluyendo mama y páncreas, a través de la activación de la señalización celular de varias vías que modifican la expresión de genes involucrados en la proliferación, la supervivencia, la migración celular y la producción de matriz extracelular (71, 72).

I-1.7. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EXÓGENOS COMO MODULADORES DEL PROCESO CARCINOGENÉTICO

Diferentes estudios realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* muestran la implicancia de los diferentes AGs en relación al desarrollo y progresión tumoral.

Como muestran los estudios antes mencionados, los PUFAs exógenos y endógenos y sus metabolitos derivados pueden alterar significativamente la expresión de genes y el metabolismo celular influyendo en el microambiente del tejido y en las interacciones célula-célula.

En este contexto, fue demostrado en estudios *in vitro* que diversas líneas celulares mostraron diferente sensibilidad al LA y AA exógeno en función del tipo celular y la concentración de AGs (73), así bajos niveles de LA (≤ 200 μ M) promovió el crecimiento de células cáncer colorrectal mientras que los niveles altos (≥ 200 μ M) indujeron apoptosis por la formación de peróxidos lipídicos. Asimismo, la exposición a concentraciones crecientes de AA, en líneas celulares de hepatoma mostró una disminución del crecimiento celular y un aumento de la apoptosis. Estos efectos estuvieron relacionados con una disminución en la expresión génica de enzimas lipogénicas tales como la ácido graso sintetasa y la hidroximetilglutaril-CoA-reductasa (74). Igualmente, Jiang et al. mostraron que el ácido gama-linoleico (GLA) redujo la adherencia de células cancerosas de colon y de mama al endotelio por la inhibición de la fosforilación de la proteína de unión connexina-43. Así también, el tratamiento con GLA indujo un aumento de la expresión de E-cadherina, una molécula de adhesión celular (CAM) que marca grados de diferenciación tumoral, en líneas celulares cancerígenas escamosas (75). Esta CAM está disminuida en carcinomas con alto grado de malignidad (76). Los niveles de E-cadherina se correlacionaron además con la formación de productos a partir de las enzimas LOXs (77).

Otros estudios *in vitro* de quimiosensibilidad, con explantos quirúrgicos de tumores de 22 pacientes con cinco variedades de malignidad, expuestos a diferentes concentraciones de GLA y ALA demostraron actividad anti-tumoral por ambos AGs, por un mecanismo de perturbación selectiva de las propiedades biofísicas de la membrana plasmática de las células malignas (78). Otros experimentos *in vitro* mostraron que el GLA induce apoptosis de las células tumorales sin dañar a las células normales. Este ácido graso produjo un aumento de radicales libres y de peróxidos lipídicos, y suprimió la expresión de los oncogenes Ras y Bcl 2-, y aumentó la actividad de p53. También parecía producir la despolarización mitocondrial, la acumulación de lípidos, y la sobreexpresión de c-Myc y p53 para lograr su acción tumoricida (79).

Asimismo, el tratamiento exógeno con AA y con los inhibidores del metabolismo de AA que conducen a la acumulación de AA esterificado, mostraron ser citotóxicos para la línea celular de cáncer de colon, HCT-116. Por otra parte, Triasin-C, un inhibidor de la acilación de AA, indujo apoptosis por aumento de la actividad de caspasa-3 (80).

Sin embargo por otra parte, los beneficios en la salud de ácidos grasos ω -3 fueron asociados con una mayor incorporación de EPA y DHA en la posición sn-2 de los

fosfolípidos de la membrana plasmática, donde el AA es generalmente esterificado. Así, el EPA y DHA reemplazarían al LA y al AA, los principales sustratos para la producción de eicosanoides de la vía de la COX, LOX, y el citocromo P-450 (81). De manera similar, la competencia entre AA y EPA para la producción de leucotrienos (LTs) explicaría el efecto antiinflamatorio de la dieta ω -3 (19). El AA es metabolizado por la 5-lipoxigenasa para formar LTB₄ que induce la inflamación, en contraste, por la misma vía se obtiene LTB₅ a partir de EPA, un metabolito por lo menos 30 veces menos potente que el LTB₄ (82). Además, el EPA y el DHA como señalamos son los precursores de nuevos mediadores lipídicos, denominados resolvinas y protectivas, que tienen una potente acción anti-inflamatoria y pueden jugar un papel importante en la protección contra diversas enfermedades inflamatorias (83).

En conjunto, todos estos estudios han permitido ampliar el conocimiento sobre el papel de los AGs en dicho proceso y evidencian la importancia del metabolismo del AA en la regulación del desarrollo y crecimiento tumoral. Entender los mecanismos de señalización regulados por AGs y sus derivados bioactivos es un punto crítico para determinar su participación en la proliferación celular y apoptosis, así como su impacto en la modulación, progresión o regresión del proceso carcinogénico.

I-1.8 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR ÁCIDOS GRASOS

Todas las células son capaces de regular la expresión de genes en respuesta a cambios en el ambiente externo, en este contexto, se ha observado en diferentes estudios que macronutrientes como los AGs así como sus derivados lipídicos, activan diferentes vías de señalización celular produciendo cambios específicos en la expresión génica, afectando de esta forma el fenotipo y comportamiento celular (84). Los AGs por sí mismos o a través de sus derivados lipídicos bioactivos pueden influir en diferentes procesos de señalización celular afectando la actividad de los factores de transcripción, moléculas claves implicadas en la regulación de la expresión génica, principalmente proteínas reguladoras de su propio metabolismo.

Los factores de transcripción son moléculas que pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, a otros factores, o directamente a la ARN polimerasa. Ellos son la maquinaria basal de transcripción, con habilidad intrínseca de

transcribir el ADN a través del promotor. En células eucariotas, los factores de transcripción generales de iniciación, forman junto con la ARN Polimerasa complejos de preiniciación correspondientes. A su vez los factores de transcripción reguladores, se unen a secuencias específicas del ADN como activadores o represores, y transmiten una respuesta apropiada a la maquinaria transcripcional de la ARN polimerasa. Al verse afectada esta unión entre ligandos se produce una modificación de la función de los factores de transcripción y consecuentemente de las vías de señalización involucradas (85, 86).

I-1.8.1 EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS SOBRE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Ha sido identificado que los AGs pueden interactuar con factores de transcripción y mediar el proceso de transcripción. Así el efecto directo de los AGs sobre los factores de transcripción más ampliamente estudiado es sobre los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs, del inglés *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*). Estos son un grupo de receptores nucleares proteicos que pertenece a la superfamilia de los esteroides / tiroideos, y funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes. Estructuralmente, el PPAR contiene un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando (LBD) que interactúa con diversos ligandos (87).

Diferentes datos evidencian que compuestos naturales como los AGs y sus eicosanoides derivados producen un efecto potenciador de la actividad de PPAR interactuando directamente con el dominio LBD de PPAR a través del grupo carboxilo de los mismos (87-89). Debido a que los PPARs funcionan como sensores para los AGs y sus derivados, esta familia de moléculas controla la expresión de la mayoría de genes implicados en el metabolismo de lípidos y en la homeostasis energética (90).

Además, hay pruebas sustanciales que indican que el PPAR juega un papel en el desarrollo del cáncer. En relación a esto, la activación de PPAR- β / δ está implicada en el desarrollo de cáncer de mama, próstata y cáncer de hígado. Sin embargo, sigue siendo una controversia considerable si el PPAR- β / δ estimula, o inhibe, en un marco homeostático la proliferación de células cancerosas (91). Se ha observado que PUFAs como LA, ALA, γ -linoleico (GLA), AA, EPA y DHA son los ligandos naturales y activadores de PPAR- α y PPAR δ . También se ha mostrado que el ácido linoleico conjugado (CLA) también se une y activa a los PPAR- α (92). En este sentido, la capacidad de unión de diferentes PUFAs a

los PPARs puede impedir el desarrollo del cáncer, mientras que los AGs saturados no se unirían ni activarían a estos factores de transcripción. Aunque una variedad de compuestos han demostrado activar a los PPAR, ha sido difícil la identificación de ligandos fisiológicamente relevantes (93) (Figura I-6).

Teniendo en cuenta estos datos, otros investigadores observaron que la regulación de PPARs se realiza directamente por la unión de los AGs al dominio LBD de PPAR y potencia así la actividad de transcripción, por lo que los PUFAs y sus biomoléculas derivadas son capaces de modular el comportamiento de los PPAR en el cáncer. Sin embargo nuevos estudios muestran que la regulación de la expresión génica por AGs a través de este factor es más compleja de lo que fue aceptado como dogma y que otros factores de transcripción estarían involucrados en la regulación por ácidos grasos (94).

Así es que, además de afectar directamente a los factores de transcripción, como al PPAR que se describe anteriormente, se conoce también que los AGs pueden también regular la actividad de los factores de transcripción indirectamente mediante la interacción con sus vías de regulación. En este contexto, la proteína quinasa C (PKC), una familia de quinasas que desempeñan papeles importantes en la transducción de señal asociada con una variedad de respuestas celulares, incluyendo el crecimiento y la diferenciación celular, la expresión de genes, la secreción de hormonas, la apoptosis y funciones de la membrana; son activadas por lípidos como el forbol 12-miristato 13-acetato o 1,2-diacil-sn-glicerol (DAG) (95).

La interacción del DAG con PKC tiene implicaciones en diferentes funciones celulares dependientes de PKC como neuromodulín, receptores acoplados a proteína G, receptores del factor de crecimiento, diversas enzimas metabólicas, las enzimas de señalización tales como las proteínas del citoesqueleto, proteínas nucleares y protooncogenes como pp60c-src (96). PUFAs de las familias ω -3 y ω -6, tales como LA, AA, GLA, EPA y DHA, compiten en la activación de la PKC- α . Una vez activada, la PKC- α induce señales mitogénicas mediante la activación de los factores de transcripción Fos, Jun y AP-1. En este contexto, Field y Murray (95) mostraron que una dieta rica en PUFAs ω -6 inducían un aumento de la proliferación celular en cáncer de colon, asociado con un incremento de PKC β II en la membrana de la células. Por el contrario, los ω -3 inhiben la carcinogénesis de colon in vivo, por inhibición directa de la actividad PKC β II que era mediada por la expresión de COX-2 y la expresión del receptor del TGF- β RII

(Fig. I-6). Por otra parte, el factor nuclear kappa B (NFkB) es un factor de transcripción que controla genes implicados en la apoptosis, inflamación, adhesión de células, proliferación, respuesta inmune adaptativa, respuesta al estrés y remodelación tisular. La interrupción de la señalización de NFkB tiene implicancias en enfermedades inflamatorias y el cáncer. Los estudios de la modulación de la actividad NFkB por ω -3 PUFAs han demostrado que impidiendo la fosforilación de Ikb selectivamente disminuye la activación de NFkB, evitando su translocación nuclear (97).

Además de los efectos sobre el Ikb los AGs tienen un efecto más complejo sobre la familia de receptores de membrana tipo Toll (TLR) que afectan “downstream” la actividad de NFkB. Lee y sus colegas identificaron que los AGs saturados como el ácido laúrico y ácido palmítico actúan como inductores de la expresión de NFkB a través de la señalización de los TLR4, mientras que los PUFAs como el DHA y el EPA mostraron inhibir esta activación de los receptores por AGs saturados (98, 99). Así aunque, los mecanismos detallados de acción no están claros, los resultados muestran que los PUFAs selectivamente puede afectar a la familia de los TLR e influenciar descendentemente la actividad NFkB, esta interacción constituye un vínculo fundamental en la señalización de otras vías en la célula (Figura I-6).

Asimismo, la proteína reguladora de esteroides SREBPs conforman otro grupo de factores de transcripción que median los efectos de los AGs de la dieta sobre la expresión génica. La tres miembros de la familia SREBP (SREBP-1a, SREBP-1c, y SREBP-c) funcionan como factores de transcripción unidos a la membrana actuando como activadores de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis e incorporación celular de colesterol, AGs, triglicéridos, y fosfolípidos. Se conoce que, mientras SREBP juega un papel importante en la síntesis de AGs y de colesterol, la activación de SREBPs es también un proceso regulado por los niveles celulares de colesterol (100, 101). Así también se ha demostrado que los PUFAs son capaces de modular significativamente la actividad del factor de transcripción SREBP-1 (102) (Figura I-6).

Por otra parte, ha sido documentado, además, que los metabolitos derivados de las enzimas LOXs y COXs son también moduladores de diferentes vías de señalización. En este contexto, algunos metabolitos derivados de estas vías enzimáticas, son capaces de activar las vías de transducción de señales que conducen a la proliferación celular o provocan una modulación positiva del comportamiento y el fenotipo de la célula que

incluyen: (a) activación de la proteína G de superficie celular, (b) la activación nuclear de PPAR, (c) la activación de señalización de la vía de Ras a través de la regulación de Ras-GAP, (d) la activación de los genes de respuesta temprana, tales como c-fos y Egr-1, (e) la activación de la PKC, (f) la activación de la vía Raf-1/Mek/Erk, (g) la activación de NF-κB inducida por ROS, (h) la activación de P21-quinasa, (i) la activación de fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) (j), y la interacción con el coactivador-1 de receptores de esteroides (103-106).

Todos estos datos aportan evidencias consistentes de la influencia de los diferentes lípidos sobre las vías de señalización celular, y aunque está demostrada la implicancia de los PUFAs y sus derivados en la carcinogénesis, los mecanismos de acción utilizados por estas moléculas así como, la identidad de los derivados lipídicos involucrados en la modulación de la expresión genética durante la transformación neoplásica permanecen poco conocidos.

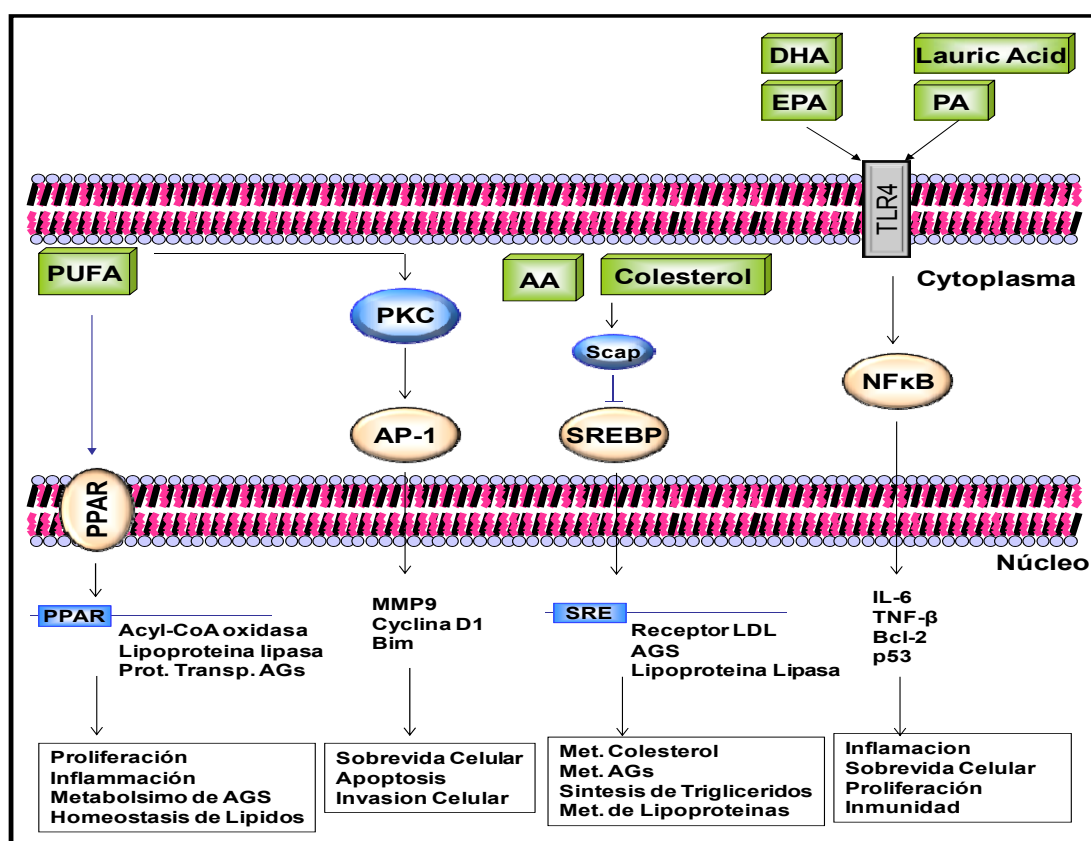


Figura I.6: Relación de los ácidos grasos en la activación directa e indirecta de factores de transcripción (Imagen de Comba A. et al – Cancer Met. Review 2011).

I-1.9 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GLI1, COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA NEOPLÁSICA

Hemos observado que la activación de las vías de los PUFAs son capaces de modular la expresión y la actividad de algunos factores de transcripción.

Las proteínas GLI son una familia de factores de transcripción los cuales operan como efectores finales de la vía de señalización de Hedgehog (HH). Estas proteínas fueron identificadas inicialmente por análisis genéticos en embriones mutantes letales de *Drosophila melanogaster*. Los resultados de los estudios de bloqueo (knock-down) de las proteínas GLI, han proporcionado información valiosa sobre funciones únicas de estos factores de transcripción en diferentes cascadas morfogénicas, lo que sugiere que una expresión o función alterada de estas moléculas podrían jugar un papel fundamental en la carcinogénesis. De hecho, la hiper activación de estos factores de transcripción podría conducir al desarrollo de tumores en diferentes tejidos incluyendo el páncreas, próstata, pulmón, mama y otros (107-109). El mecanismo propuesto para la regulación del proceso carcinogénico consiste en la modulación de la transcripción específica de los genes diana que contribuyen al fenotipo transformado. Por ejemplo, el factor GLI1 es un oncogén candidato para cierto número de los tumores, ya que estos participan en el aumento de la expresión de moléculas antiapoptóticas (BCL-2, BCLX-L) (110-112), moléculas involucradas en proliferación celular (Cyclin D, Cyclin E, Myc) y angiogénesis (pdGF, VEGF), aumentando así la supervivencia y malignidad de las células cancerosas en diferentes tejidos (108).

En vertebrados, la familia GLI se compone de 3 miembros diferentes GLI 1, GLI2 y GLI3. Estas tres isoformas contienen cinco dominios muy conservados de unión al ADN, con un motivo estructural de dedos de zinc C_2-H_2 que se unen a la secuencia consenso GACCACCCA, así como también señales de localización y exportación nuclear que regulan la ubicación de GLI a nivel subcelular (113). Estas proteínas contienen también un dominio de activación C-terminal, y un dominio de represión N-terminal, estando sólo presente en las isoformas de GLI2 y GLI3. Estudios transcripcionales con genes reporteros y de expresión génica han demostrado que GLI1 funciona como un fuerte activador de la transcripción y en su estructura no parece contener un dominio represor (Figura I-7). La expresión de GLI1 es dependiente de la transcripción mediada por GLI2 y / o GLI3, de manera que la expresión de GLI1 puede ser usada como marcador del estado de activación

de la vía. El análisis de dichos mecanismos ha revelado que el dominio C-terminal de activación modula la transcripción a través de la interacción con las moléculas coactivadoras tales como la acetiltransferasa p300. Con respecto a la actividad represora, se ha informado que son dependientes de SKI-o mSIN3A. Estos correpresores se unen a GLI y reclutan el complejo histona deacetilasa a su genes diana (114). Asimismo, la degradación de estos factores es sumamente relevante y es un proceso que puede ser regulado. Los estudios de Huntzicker et al. (115) mostraron dos secuencias de degradación en GLI1, el “degron N” y “degron C”, que median el reconocimiento de Gli1 por la proteína β -TrCP (del inglés β -transducina-repeat containing protein) E3 ubiquitina ligasa, para permitir la ubiquitinación y la degradación de Gli1 en el proteasoma. Esta secuencia, sitio de fosforilación, está presente en ambos degrones de Gli1. Asimismo, la degradación de GLI1 a través de β -TrCP parece ser completa, sin la generación de fragmentos que puedan parecerse a un represor transcripcional, en contraste con la degradación de Gli2 y Gli3 que si genera segmentos represores. En humanos. GLI1 contiene cinco sitios de fosforilación candidatos para PKA (Thr296, Thr374, Ser544, Ser560 y Ser640), pudiendo ser fosforilado *in vitro* e *in vivo* por esta quinasa. El papel de PKA en la actividad de GLI no es totalmente claro, pero parece cumplir la función de retener a GLI1 en el citoplasma. En cuanto a GLI2 y GLI3, estas isoformas tienen un alto grado de similitud en sus secuencias, incluyendo dominios activadores y represores, así como múltiples sitios de fosforilación. Sin embargo, en ensayos reporteros con modelos *in vitro* han mostrado que GLI2 posee una actividad transcripcional más intensa que GLI3, pero más débil que GLI1 (116).

Diferentes estudios han caracterizados diferentes vías de activación de GLI, por un lado la “vía canónica”, en la cual la actividad de GLI es regulada por la vía HH y por otro lado, una “vía no canónica” en la cual la activación de GLI es independiente de esta vía (Figura I-7 b y c).

La vía canónica de señalización de HH tiene un rol fundamental durante los procesos celulares normales implicados en la embriogénesis, posteriormente en los tejidos adultos esta vía esta involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, de la población de células madres y de los procesos de diferenciación (117, 118).

La proteína HH secretada es modificada por actividad lipídica con la adición de una molécula de colesterol y de ácido palmitoleico. Esta proteína se liga ahora al receptor

transmembrana “Patched” (PTCH1) de las células receptoras; después de esta unión se rompe el efecto inhibitorio de PTCH1 sobre la proteína transmembrana “Smoothed” (SMO), permitiendo de esta forma que se active la cascada de señalización, que a su vez activan a los factores de transcripción GLI, GLI 2 / 3 activados inducen la transcripción de genes diana como GLI1, PTCH, Ciclinas de tipo D, la IMC1 y BCL2. La expresión de Ptc resulta de una retro alimentación negativa mediante la inhibición de la señal en la membrana, mientras que la expresión de GLI1 conduce a un mecanismo de alimentación positivo que induce genes específicos de GLI1.

La proteína transmembrana SMO tiene similitud con proteína G-receptores acoplados y es la entidad de señalización central en la membrana. En ausencia de ligando, SMO se mantiene inactiva y el factor de transcripción GLI es secuestrado por el complejo citoplásmico que incluye COSTAL, FUSED y al supresor del FUSED (SUFU). La fosforilación de GLI por la PKA, GSK3 y CK1 lleva al procesamiento en el proteasoma de la longitud completa de la molécula de GLI3, y de GLI2 en menor medida, que es constitutivamente escindido en un fragmento represor truncado. Como consecuencia, la activación transcripcional de los genes diana Hedgehog se reprime a través de Sin3-HDAC o mecanismos de SKI-HDAC-dependientes (114, 119).

En varios tipos de cánceres humanos se ha demostrado, además de una frecuente activación de la vía HH por sobreexpresión del ligando o mutaciones en los receptores PTCH o SMO una activación aberrante de esta vía independiente del ligando que implica modificaciones en distintos niveles de la vía, como ser la amplificación de GLI1 o GLI2, translocación del cromosoma de GLI1 o la desregulación en la expresión de genes diana (120). Estos datos fueron de particular relevancia, dado los esfuerzos en curso en el desarrollo de fármacos de molécula pequeña que actúan como antagonistas de SMO, en cánceres que se activan “downstream” de la vía de HH y serían resistentes al tratamiento con estos fármacos.

En este contexto, en estas células cancerosas, informes recientes sugieren que la actividad GLI puede ser modulada de una manera independiente de HH (vía no canónica), a través de la vía RAS - MEK / AKT, que regula la localización subcelular y la estabilidad de los factores de transcripción GLI. Además, Dennler et al. demostraron que el TGF- β puede aumentar la expresión y la acción prolongada de GLI a través de señalización de HH

por un mecanismo dependiente de SMAD3 (114). Sin embargo no se conoce totalmente la regulación del factor de transcripción GLI1 en forma no canónica.

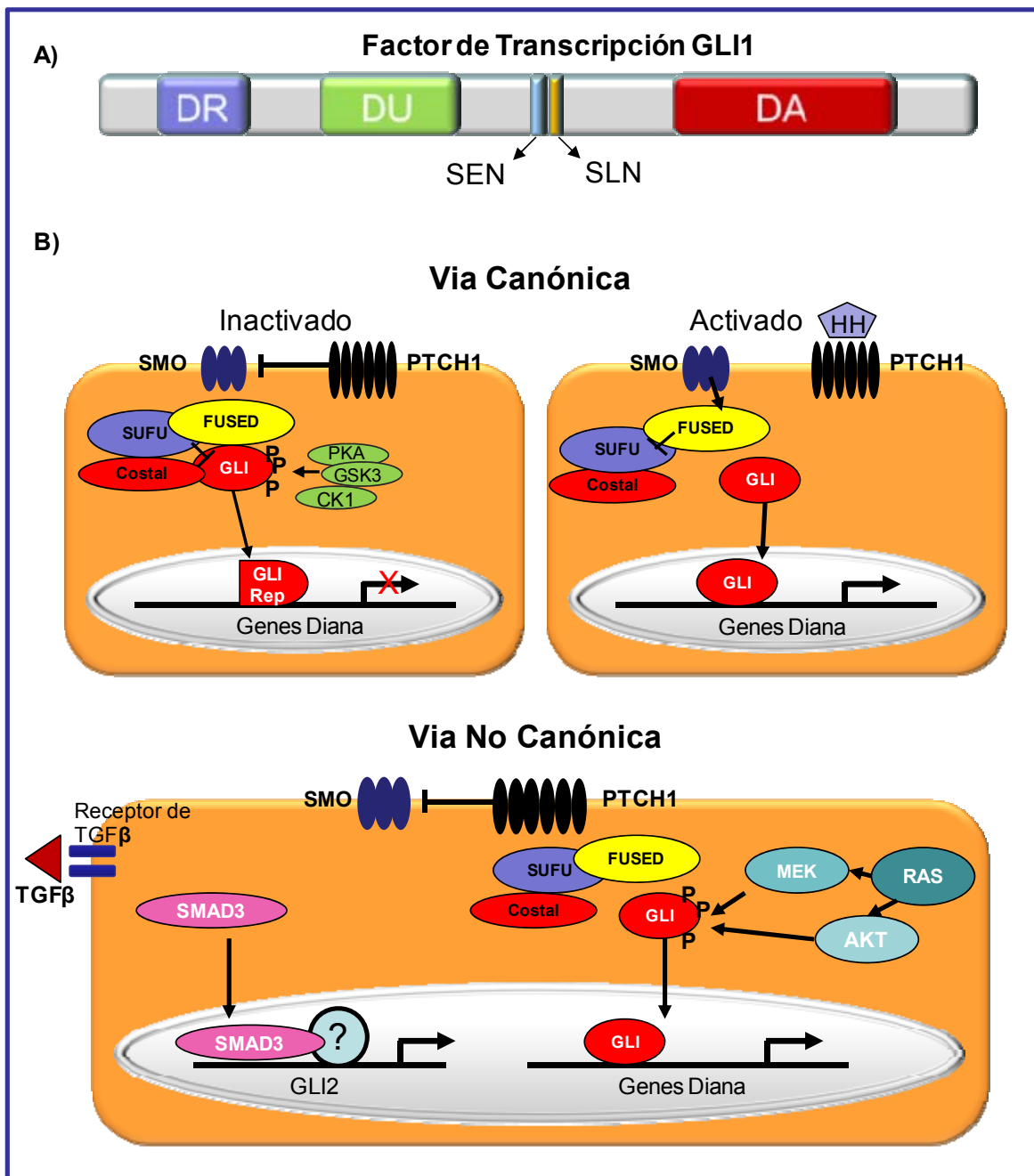


Figura I-7: A) Factor de transcripción GLI1: Representación esquemática de sus dominios funcionales. B) Vías de regulación del factor de Transcripción GLI1: Vía Canónica dependiente de HH y vía no Canónica independiente de HH (Adaptado de Fernandez Zapico M.E. - Pancreatology 2008).

I-2. HIPOTESIS

Hemos descrito que los PUFAs modulan la actividad de factores de transcripción y de sus vías de señalización asociadas. Se ha descrito que GLI1 regula la muerte celular en células cancerosas a través de la activación de la expresión de proteínas anti-apoptótica favoreciendo de esta manera la perpetuación de la célula transformada en diferentes tejidos. Por lo expuesto, nos planteamos el interrogante de sí, en los modelos a utilizar en el presente proyecto, la variación lipídica de las membranas que se induzca experimentalmente a través del PUFA AA, generaría variaciones en el metabolismo de los PUFAs, afectando la expresión génica de diferentes líneas celulares cancerígenas a través de la modulación de la actividad del factor de transcripción GLI1 en el desarrollo tumoral, preguntándonos si el estudio propuesto permitiría conocer nuevos mecanismos moleculares implicados en la biología tumoral.

I-3. OBJETIVOS

Objetivo general: Nos propusimos en consecuencia estudiar en el presente proyecto si la activación de la vía del ácido araquidónico (AA) regula la actividad del factor de transcripción oncogénico GLI en su función como regulador de moléculas antiapoptóticas, como uno de los mecanismos moduladores (activador/inhibidor) responsables de la muerte y proliferación celular en carcinomas epiteliales de mama y páncreas.

Objetivos específicos:

En experimentos in-vivo, ex-vivo:

- 1) Determinar el rol del AA en el desarrollo tumoral en un modelo experimental de adenocarcinoma mamario murino.
- 2) Determinar el efecto del AA en la supervivencia de las células cancerosas de tejidos tumorales.
- 3) Determinar el efecto del AA en el desarrollo de metástasis en pulmón.

En experimentos in-vitro:

- 1) Determinar el rol del AA en la regulación de la muerte celular en líneas cancerosas de mama y páncreas.
- 2) Evaluar el efecto del AA en la expresión y actividad transcripcional de genes anti-apoptóticos (BCL-2, BFL-1 y 41BB).
- 3) Determinar el efecto del AA en la expresión y actividad del factor de transcripción oncogénico GLI1, como mediador de la muerte celular inducida.
- 4) Determinar si los genes antiapoptoticos, BCL-2, BFL-1/A1 y 41BB son genes diana de la actividad transcripcional de GLI1.
- 5) Determinar el efecto del AA sobre el perfil lipídico de membrana y la activación de sus vías metabólicas.
- 6) Evaluar el efecto de la inhibición de las vías metabólicas del AA sobre el factor de transcripción GLI1.

II- ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

II-1. Modelos in vivo, ex-vivo:

Los estudios *in vivo* fueron llevados a cabo de acuerdo a las exigencias del comité de uso y cuidado de animales de laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba (www.secyt.fcm.unc.edu.ar/comite.htm). Para el desarrollo de este objetivo se utilizaron ratones de ambos sexos de la cepa BALB-c los cuales fueron mantenidos en grupos de 2 a 4 animales en cajas de policarbonato. El agua y la comida fueron provistas *al libitum* y los animales fueron mantenidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura constante de 20 °C.

Se generaron tumores a partir del inóculo subcutáneos de células de la línea LM3, establecida en el Instituto Angel Rofo (Buenos Aires) a partir de cultivos primarios de un adenocarcinoma mamario murino (M3) de ratones de la cepa BALB-c (121). A los 90 días del nacimiento los huéspedes fueron inyectados subcutáneamente en la línea mamaria izquierda con 1×10^6 células por animal en 200 μ l de MEM sin suero. A partir del momento en que el tumor fue palpable los animales fueron distribuidos al azar a en dos grupos, uno tratado y otro control. El grupo tratado (n=10) fue inyectado en la base del tumor con AA 90% (Un-Check Prep Inc; MN, USA) a una dosis de 0,70 mg AA/g de peso del animal. El grupo Control (n=7), fue inyectado con buffer normal salino. Estas inyecciones se repitieron cada 7 días en un periodo total de 21 días, luego de los cuales se sacrificaron los animales para el estudio de los diferentes parámetros tumorales (69). Con respecto a las dosis de AA inyectadas, se determinó que esta dosis fue tolerada adecuadamente en la totalidad de los animales de experimentación, ya que mediante experimentos preliminares se observó que una dosis superior de 1,14 mg AA/g de peso resultaba tóxica para los animales

II-1.1. Evaluación del crecimiento tumoral:

El crecimiento del tumor se determinó empleando un calibre digital para medir el volumen del tumor a diferentes tiempos, este se determinó cada 7 días durante 21 días

totales, luego de la aparición del tumor palpable. El volumen tumoral fue calculado a través del diámetro trasversal (ancho) y longitudinal (largo) y usando la fórmula: $\text{Volumen} = \text{largo} \times \text{ancho}^2 / 2$ (69, 122). A los 21 días los animales fueron sacrificados y se extrajo inmediatamente el tumor que denominamos, primario el cual fue fijado en formol y utilizado para posteriores estudios y análisis.

II-1.2. Ensayo de apoptosis en células del tejido tumoral:

Para la determinación de apoptosis se utilizaron cortes de los tejidos tumorales previamente fijados y parafinados provenientes de los grupos Control y Tratados. Se determinó y cuantificó apoptosis *in situ* mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) basada en la detección y marcación de los extremos 3'-OH del ADN fragmentado, característico de la apoptosis. Se utilizó para esto el Kit de detección fluororimetrico DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Las secciones tumorales fueron además marcadas con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para visualización de núcleos. Los núcleos marcados con TUNEL Y DAPI fueron examinados bajo microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany). Las células TUNEL positivas fueron cuantificadas en diez campos al azar no superpuestos en cada sección de tejido tumoral con una magnificación de 200X (123).

II-1.3. Análisis de Incidencia de metástasis en pulmón

La formación de metástasis se evaluó mediante examen microscópico en tejidos de pulmones fijados en formol 4% y teñidos con H&E. Se estudió un corte de 7 μM , se descartaron 20 de espesor, luego se estudió otro y así sucesivamente hasta seccionar un pulmón de aproximadamente 1 cm^3 del órgano. El examen de los tejidos se llevo a cabo por dos observadores sin conocimiento de la condición experimental, por determinación de presencia o ausencia de micrometástasis en este tejido, se utilizó un microscopio Leica DM500 a una magnificación de 100X (69).

II-2. Modelo in Vitro:

II-2.1. Líneas Celulares y condiciones de cultivo:

Se utilizaron las líneas celulares humanas provenientes de estirpes cancerígenas de mama y páncreas. Las líneas celulares de mama, MCF-7 (moderadamente diferenciada) y de páncreas, Panc-1 (poco diferenciada) adecuadamente tipificadas fueron obtenidas de la American Type Cell Collection, USA. Las células de páncreas humano L3.6 (poco diferenciada) fueron gentilmente provistas por I. J. Fidler, Ph.D University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Además se utilizó la línea celular LM3 establecida en el Instituto Ángel Rofo a partir de cultivos primarios de un adenocarcinoma mamario murino (M3) de ratones de la cepa BALB-c (121). Las líneas celulares de mama fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM), la línea celular de páncreas Panc-1 fue cultivada en Medio Esencial Dulbecco Modificado Alta Glucosa (DMEM) y para las L3.6 se utilizó Medio Mínimo Esencial Modificación alpha sin nucleótidos (MEM α s/ r-d), todos los medios fueron suplementados con 10% SFB y con 100 IU/ml penicilina G y 100 μ g/ml de estreptomicina, incubadas at 37 °C y en una atmósfera de 5% CO₂ (124, 125).

II-2.2. Plásmidos utilizados:

Para las tranfecciones celulares transitorias se utilizaron los siguientes plásmidos:

Vectores Reporteros: 8X-GLI es un vector sintético con sitios específicos de unión de GLI que se utiliza como marcador de su actividad, contenido en el vector pGL2 (Promega, Madison, WI), el vector original fue provisto por Hui, CC (University of Toronto). GLI1 promotor contenido en el vector pGL3 (Promega, Madison, WI), el original fue obtenido del Dr. Fritz Aberger (Institute of Genetics, University of Salzburg, Salzburg, Austria). Se utilizaron además vectores con deleciones en la región del promotor de GLI1 (-350 pb y -750 pb), construidos y provistos por el Dr. Martín Fernandez Zapico, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

BCL-2 promotor contenido en el vector pGL3, provisto originalmente por Linda Boxer (Stanford University School of Medicine). BFL-1/A1 promotor contenido en el vector pGL3, provisto originalmente por Dr Gelinás (University of Medicine and Dentistry of New Jersey–Robert Wood Johnson Medical School) y el vector promotor 41BB

promotor contenido en el vector pGL3, obtenido originalmente del Dr. Chang-Yuil Kang, Laboratory of Immunology and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, South Korea)

Vectores de expresión: GLI1 contenido en el vector PCMV 3XFLAG, con una secuencia codificante de aminoácidos del 1 al 1107. NFATc1 originalmente clonado por el Dr. A Rao (Harvard Medical School, Boston, MA).

Vectores de Silenciamiento: Se utilizaron plásmidos de expresión de ARN de interferencia (shRNA: short harpin RNA) shGLI1 (1)/ shGLI (2)/ NT pcmv (pCMV 3XFLAG) (Sigma Aldrich).

Todos estos plásmidos han sido previamente utilizados por colaboradores (126, 127). Los mismos fueron amplificados en nuestro laboratorio utilizando protocolo de transformación en bacterias de la cepa Echeriquia coli DH5- α y purificados utilizando columnas de silica comerciales siguiendo el protocolo del fabricante (Quiagen Plasmid Maxi Kit Protocol, Quiagen, Inc. USA).

II-2.3. Tratamiento celular:

En cada uno de los ensayos descritos en los ítems de abajo, células sin tranfectar o 24 horas post- tranfección, fueron tratadas con el añadido exógeno de ácido araquidónico (AA), (Nu-Chek Prep Inc, USA), para la activación de esta vía. El AA fue diluido en etanol 99% a una concentración inicial de 100mg/ml. Esta solución fue alicuotada y gaseada con N₂ y mantenida a -80°C. Se utilizaron diferentes concentraciones de AA para determinar su actividad celular, 5 μ g/ml (16 μ M), 20 μ g/ml (64 μ M), 40 μ g/ml (128 μ M), 60 μ g/ml (192 μ M) y el vehículo como control. El tratamiento con AA fue realizado en medio de cultivo con 5% de suero fetal bovino. Luego del tratamiento, todas las muestras fueron recolectadas y preparadas para los diferentes ensayos.

En algunos experimentos, las células fueron tratadas a su vez con un inhibidor general de Caspasas, Q-VD-OPH (SM, Biochemicals, USA). El mismo fue utilizado a una concentración final de 20 μ M en DMSO y adicionado desde el momento en se sembraron las células.

Además, se utilizaron para algunos experimentos los siguientes antioxidantes para inhibición general de peroxidación lipídica: L-Glutation (Enzo Life Science, USA) y N-Acetil Cisteina (Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 250 μ M. Por otra parte, para

inhibición de las enzimas COXs y LOXs se utilizaron los siguientes inhibidores: Acido Nordihidroguaiarético (Enzo Life Science, USA) a una concentración de 50 μ M y 100 μ M. Para inhibición de la enzima COX en forma mas específica se utilizó Ibuprofeno (Enzo Life Science, USA) a una concentración de 15 μ M y Indometacina (Enzo Life Science, USA) a una concentración de 0,65 μ M.

II-2.4. Ensayo de viabilidad celular:

Se determinó la viabilidad celular mediante la técnica colorimétrica y fluororimétrica de Resazurina (Resazurin Sodium Salt – SIGMA Aldrich, USA) (128). Se sembraron 5.000 células por pozo, en placas de 96 pozos, estas fueron cultivadas con sus respectivos medios suplementado con SFB 10%. Luego de 24 horas se las cultivó con medio con SFB al 5%, se realizó el tratamiento exógeno con las diferentes concentraciones de AA y el correspondiente vehiculo control etanol por 24 horas. Al cabo de este período se añadió 2 μ l de Resazurina solución madre 1mg/ml a 200 μ l de medio por pozo y se dejo incubando a 37 °C por 4 horas. Al cabo de las mismas se leyó por fluorescencia en lector de micro placas FL X800 Microplate Reader (BIO-TEK Instruments, Inc) a una longitud de onda de 560 Ex/590Em.

II-2.5. Ensayo de Apoptosis:

II-2.5.1. Análisis de apoptosis por microscopía de fluorescencia: la apoptosis se determinó mediante marcación fluorescente del ADN con HOECHST 33258 (123). Se sembraron 250.000 células por pozo en placas de 6 pozos, e incubadas por 24 horas en medio de cultivo completo. Luego fueron tratadas con el añadido exógeno de AA a diferentes concentraciones en medio suplementado con 5% de SFB por 24 horas. Se retiró el medio, se lavó con PBS, luego se fijó con una solución 500 μ l PBS y 500 μ l metanol: acido acético glacial 3:1 por 5 minutos, posteriormente se retiró y se añadió 500 μ l metanol: acido acético glacial 3:1 por 10 minutos. Luego se retiró y agregó 1 ml de PBS mas el colorante HOECHST 33258 a una concentración final de 5 μ g/ml, se incubó 10 minutos a 37 °C y luego se examinaron en microscopio de fluorescencia a una magnitud de 200X (Carl Zeiss Axioskop 426126 epifluorescence microscope, Germany). Se cuantificaron células en apoptosis según la morfología característica de apoptosis utilizando el software

ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se calculó el índice apoptótico según número de células en apoptosis en relación al número de células totales.

II-2.5.2. Ensayo fluororimétrico de Caspasas 3/7: Se determinó además apoptosis mediante medición de actividad de caspasas 3/7 para lo cual se utilizó el kit Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison). Se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos. Después de 6 y 24 horas de tratamiento se le agregó 100 µl de reactivo Apo-ONE® Caspase-3/7 a cada pozo conteniendo un volumen de 100 µl de medio de las células en cultivo. Se incubó a temperatura ambiente por 6 horas y se leyó la señal fluorescente a una excitación de onda de 485 y a una longitud de emisión de 527 en lector de placas FL X800 Microplate Reader, (BIO-TEK Instruments, Inc).

II-2.6. Tranfecciones celulares transitorias:

Se realizaron tranfecciones celulares transitorias con los vectores antes mencionados para sobreexpresión o silenciamiento de las diferentes proteínas involucradas en este proyecto así como también para estudios reporteros de luciferasa. El protocolo de tranfección fue puesto a punto en experimentos preliminares para cada línea celular mediante la técnica de electroporación y lipofección. Las líneas celulares MCF-7 y PANC-1 fueron tranfectadas con lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se sembraron 5×10^4 y 7×10^5 células en placas de 12 pozos o capsulas de 100 mm respectivamente, 24 horas antes de la tranfección para una confluencia del 80% de densidad celular al momento de la tranfección. En las tranfecciones se utilizó una relación 1:2,5 ADN: lipofectamina, y para cada condición 2 µg de los vectores reporteros GLI-luciferase, GLI1-promotor, GLI1-promotor con deleciones, BCl-2-promotor, BFL-1-promotor y 41BB-promotor. Para tranfecciones múltiples, se usaron 10 µg de DNA, siendo 1 parte (1 µg) del vector promotor y 9 partes (9 µg) del vector de expresión GLI1 y NFATc1. En los experimentos de silenciamiento se tranfectaron 10 µg de los vectores de *shGLI1* o *shGLI1* por 72 horas. En los experimentos de rescate fueron utilizados en conjunto, 1 µg del vector reportero GLI-LUC junto con 9 µg del vector de expresión por 48 horas. En cada experimento, fue tranfectado como control la misma cantidad del vector vacío (129).

Se determinó y utilizó para las líneas celulares L3.6 y LM3 condiciones de electroporación a través de un único pulso de 375 V, una resistencia de 72 Ω ms y capacitancia de 800 μ F (Electroporador BTX, ECM® 600). Se utilizó un total de 30 microgramos de ADN plásmido total y $2,5 \times 10^6$ células/ml por cada una de las condiciones., y manteniendo las mismas relaciones utilizadas para tranfección con lipofectamina antes descritas. Para estos experimentos preliminares se ha utilizado como plásmido de expresión el gen de una proteína de fluorescencia verde (EGFP), indicando una eficiencia de tranfección del 18-40% en estas condiciones, lo que dio factibilidad a estos experimentos.

II-2.7. Actividad Transcripcional: Ensayo Reportero de Luciferasa:

Para la determinación de la actividad transcripcional se utilizó el ensayo de Luciferasa. Las células fueron tranfectadas de acuerdo a las condiciones antes mencionadas con los diferentes plásmidos de expresión y reporteros antes descritos. Las células se sembraron por triplicado, 5×10^4 células por pozo en placas de 12 pozos en el correspondiente medio de cultivo. Después de 24 horas de tranfección se trataron con el añadido exógeno de diferentes concentraciones del PUFA 20:4 ω -6, el AA y a posteriori fueron recolectadas y preparadas para el ensayo de luciferasa acorde al protocolo sugerido por el fabricante (Promega), la actividad de luciferasa fue medida con un luminómetro (GloMax®-Mult Microplate Multimode Reader). Para controlar la variación la eficiencia de tranfección entre las muestras se determinaron proteínas totales mediante el ensayo de determinación de proteínas de BioRad (BioRad, Hercules, CA) y se normalizaron los valores obtenidos de lecturas de luminescencia en relación al contenido de proteínas. La actividad relativa de luciferasa corresponde a las lecturas de luciferasa/lectura concentración de proteínas normalizadas en relación al grupo control dentro de cada experimento (129).

II-2.8. Transcripción Reversa – Reaccion en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR):

Se determinó la expresión génica de ARNm de los genes GLI1, BCL-2, BFL-1, 41BB por qRT-PCR. El ARN total fue extraído de células en cultivo usando el reactivo

TRIZOL (Invitrogen). El ADN complementario (cDNA) fue generado a partir de 5 µg de ARN por transcripción reversa usando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para cada muestra, se usaron para el análisis de PCR 2 µl de cDNA de la reacción de síntesis diluido 1:10. El análisis de expresión en tiempo real fue llevado a cabo utilizando la metodología TaqMan® fluorescence y ABI 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron para esto primers/sondas prediseñados para la expresión de GLI1, BCL-2, BFL-1, 41BB y 18 S humanos, adquiridos en Applied Biosystems. La cantidad del transcrito fue calculada y expresada como la diferencia relativa al gen control 18S ($2^{-\Delta Ct}$, donde ΔCt representa la diferencia del umbral de ciclos entre el gen de interés y el gen control) (129).

II-2.9. Ensayo de Inmunoprecipitación de Cromatina (CHIP):

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue llevado a cabo siguiendo el protocolo de Magna ChIP kit protocol (EMD Millipore, Bedford, MA).

Las células PANC-1 (7×10^6) se fijaron con 1% de formaldehído adicionado directamente al medio de cultivo por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas y levantadas por raspado con búfer fosfato salino y centrifugadas a 800 x g por 5 minutos a 4°C. Luego se las resuspendió en búfer de lisis e incubó en hielo por 15 minutos. El pellet fue luego resuspendido en bufer de lisis nuclear y sometido a sonicación para obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 700 pb a 4°C. Las muestras fueron luego inmunoprecipitadas usando los anticuerpos NFATc1 (Santa Cruz, Biotechnology), GLI1 (Cell Signalin Biotechnology), IgG normal de cabra (Millipore) o IgG normal de conejo (Millipore), las cuales fueron mantenidos toda la noche a 4°C en rotación. A continuación, las muestras inmunoprecipitadas se lavaron y eluyeron usando el kit de inmunoprecipitación siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se revirtió la unión proteína-ADN a 62°C por 2 hr, seguido de 10 min a 95°C y el ADN inmunoprecipitado fue purificado con columnas (EMD Millipore, Bedford, MA) y subsecuentemente amplificado por PCR convencional o PRC cuantitativa utilizando el fluorocromo para detección Syber Green (Bio-Rad). Las PCR fue llevada cabo usando un set de primers para la región de 350 pb del promotor de GLI1 la cual contiene sitios potenciales de unión de NFAT: 1) sentido AGCAGTATAGGGTCCCTCAAG, antisentido CGCGAGAAGCGCAAAC; y además set de primers para distintos sectores de la región de 2000 pb por encima del sitio de inicio

transcripcional del promotor de BCL-2, BFL-1/A1 y 41BB, el cual contiene sitios potenciales de unión de GLI1:

1) BCL-2: (sentido ACACACGTCTGCGAGTGTGAATGT antisentido CCCTCTGTCCCTAACACCTTT2). 2) BFL-1/A1: (sentido GAGTATCTGTTGGGTGTATACCTATG antisentido GATGATACATGGAGGCTGGTGGAA). 3) 41BB: (sentido ATCTGTGACA CATCCTGACAGTAGA antisentido ACATGTGGAAAGACCTCCCTGTTC) y (sentido GAACAGGGAGGTCTTTCCACATGT anti TGATGAAATCTGGCACAGGTATGAT) (129). Los Productos de PCR convencional fueron visualizados en geles de 2% de agarosa.

II-2.10. Western Blot:

El análisis de inmunoblotting fue llevado a cabo como se describe previamente en (129, 130). Células PANC-1 (1×10^6) fueron sembradas en placas de 100 mm en medio completo y después de 24 horas se trataron con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos. Después del correspondiente tiempo de tratamiento las células fueron lisadas. El extracto completo de células (50 μg de proteínas) fue separado por 7,5 % SDS-PAGE y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Anti-GLI1 (Cell Signalling, Danvers, MA), Anti- α -ACTIN (Calbiochem) y Anti-Hsp70 (Stress gen). Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidada y las proteínas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia (GE Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA).

II-2.11. Determinación de ácidos grasos de membrana de células tumorales por GLC:

El perfil de ácidos grasos de membranas de las células se realizó siguiendo la metodología propuesta por Calderón, R.O. & Eynard, A.R. (25). Suspensiones de 6×10^7 células se homogeneizaron en buffer hipotónico en frío (50 mM de manitol + 5 mM Hepes) y se resuspendieron luego con Cl_2Ca 1M. Sus membranas fueron separadas en ultracentrífuga a 35000 rpm durante 30 min. La extracción y partición de lípidos totales de membranas se realizó con soluciones de cloroformo:metanol (1:2 v/v) y cloroformo:metanol:agua (3:48:47 v/v) (37). La saponificación de los lípidos extraídos se llevó a cabo

con una solución de KOH 10 % (p/v) en metanol 50 % (v/v). Posteriormente se realizó una esterificación empleando una solución de HCl 3 % (v/v) en metanol. Finalmente, los ésteres metílicos de AG se identificaron y cuantificaron, comparando sus tiempos de retención relativos con estándares comerciales (Un-Chek.Prep, MN, USA) por GLC mediante Cromatógrafo de gas (Perkin Elmer precisely, Clarus 500 GC, Connecticut, USA).

II-2.12. Determinación de Peroxidación Lipídica no Enzimática:

II-2.12.1. Técnica de “Ferric Xilenol Orange” (FOX): Se determinaron peróxidos totales mediante la técnica de Ferric Xilenol Orange (FOX). Este método se basa en la oxidación de inones ferrosos (Fe^{2+}) a iones ferricos (Fe^{3+}) por peróxido de hidrógeno bajo condiciones de acidez. Se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos las cuales fueron tratadas con AA por 24 horas. Se prepararon los reactivos a utilizar: Reactivo Coloreado (XO): BHT 480 μ M/L, XO 15 μ M /L en MetOH 90% y el catalizador (FAS): sulfato NH_4 ferroso 2,50 mM y 0,025 M ácido sulfúrico. Luego, se hicieron reaccionar al momento del uso el reactivo XO: FAS en una relación 100:1. Se descartó el medio de cultivo se agregó 10 μ L de SDS al 1% por 30 minutos y luego se agregaron 100 μ L por pozo de XO:FAS. Se dejó actuar 30 minutos a temperatura ambiente. Los iones férricos se unen al marcador indicador xilenol orange para formar un complejo coloreado, el cual fue medido a 540 nm con multilector de placas (GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader, Promega, UK), como una medida indirecta de concentración de hidroperóxidos (131).

II-2.12.2. Técnica de Gama Glutamil Transpeptidasa (GGT): Se determinó actividad de la enzima Gama Glutamil Transpeptidasa como indicador indirecto de estrés oxidativo celular. Se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos. Después de 24 horas de tratamiento con AA y el vehículo control, se retiró el medio de cultivo y se extrajo la enzima de las membranas celulares usando 20 μ L de Triton X-100 al 1% por 30 minutos. Luego la enzima GGT fue medida siguiendo las indicaciones del Kit Wiener Lab Gg-Test Cinética AA, según las indicaciones del fabricante, adaptadas a determinaciones en cultivo celular (132). A 10 μ L de la suspensión se le agregaron 100 μ L

de sustrato + buffer reconstitutivo y se dejó actuar por 10 minutos a 37 °C. Para la normalización de las lecturas se determinaron proteínas totales mediante el ensayo de determinación de proteínas de BioRad (BioRad, Hercules, CA). Se leyó la cinética de la reacción a 450 nm: Tiempo 0 – Tiempo 15 min. Las lecturas fueron realizadas en el lector antes mencionado. Se determinó UI de GGTP: $(\text{abs}(f)-\text{abs}(i)) / T (tf-ti) \times 1158 = \text{UI GGTP}$ y actividad específica de GGTP: $\text{UI GGTP} / \text{mg Prot.}$ Las lecturas se normalizaron luego con el grupo control en cada experimento.

II-2.13. Determinación de Peroxidación Lipídica Enzimática (LOXs y COXs) por HPLC:

La actividad enzimática se determinó mediante el análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), de la producción de los siguientes metabolitos derivados enzimáticamente del AA: 12-(S)-HHT producidos por la vía COX y 12-(S)-HETE, 15-(S)-HETE y 5-(S)-HETE por la vía de las LOXs. La determinación de todos los metabolitos se realizó según metodología descrita en (69, 77). Células MCF-7, LM3 y PANC-1 fueron sembradas en placas de 100 mm, después de 24 horas las mismas fueron tratadas con AA y vehículo control por 24 horas en 6 ml de medio de cultivo. Luego, para extracción de los metabolitos se tomó el medio de cultivo y fijó con 6 ml de metanol, luego estas suspensiones fueron filtradas en columnas de extracción de fase sólida (Strata C18-T 100 ng/ml Phenomenex). Los metabolitos se eluyeron de las columnas con 1 ml de metanol y secados con nitrógeno hasta su análisis por HPLC. Para separar, identificar y cuantificar los eicosanoides se utilizó un cromatógrafo Beckman SYSTEM GOLD, provisto de una bomba (Programable Solvent Module 126) y con detector UV (Programable Detector Module 166). La separación se realizó en una columna Phenosphere-Next C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm). Las muestras fueron resuspendidas e inyectadas en 100 µl de metanol. Se realizó un gradiente de disolventes comenzando con 50% del disolvente A (50% metanol y 50% agua bidestilada, 0,02% ácido acético) y 50% del B (metanol puro). Se redujo paulatinamente la proporción de A hasta llegar a 100 % de B a los 25 min de corrida. Posteriormente, entre los 30 y 35 minutos, la proporción del disolvente A se aumentó linealmente hasta restablecer la composición original del sistema. Se trabajó a un flujo de 1 ml/min y a una temperatura de 27 °C constantes durante el tiempo total de análisis. Se

utilizó una longitud de onda de 235 λ hasta el final del análisis. Los eicosanoides fueron identificados comparando sus tiempos de retención relativos y espectros UV con estándares comerciales (BIOMOL Research Laboratory Inc. USA). Los mismos se cuantificaron mediante una curva de calibración con cada uno de los estándares comerciales y se expresó como ng/ 7×10^4 células/ml.

II-2.14. Análisis Estadístico:

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante los modelos de análisis de la varianza (ANOVA) según el diseño experimental planteado, evaluando previamente los supuestos. Para comparación de medias se utilizó el test a posteriori de comparación múltiple Duncan ($p < 0,05$). Además, se utilizó el método de Chi cuadrado para establecer asociación entre los tratamientos y la respuesta dicotómica incidencia de metástasis ($p < 0,05$). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y repetidos al menos tres veces, al menos que se aclare lo contrario. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el software InfoStat (Grupo InfoStat, Argentina).

III- RESULTADOS

A los fines de una comprensión mas precisa de los datos surgidos de cada situación experimental planteada, los subtítulos, en afirmativo, indican los resultados más relevantes.

III-1. EL AA EXÓGENO ES INCORPORADO EN LAS MEMBRANAS CELULARES

En primer lugar se evaluó el perfil de ácidos grasos de las membranas celulares como control de la incorporación del AA en nuestros tratamientos en los experimentos in vitro con diferentes células tumorales. Células PANC-1 tratadas con diferentes concentraciones de AA por 6 horas mostraron una variación del perfil de ácidos grasos de membrana (Tabla III-1). Se observó un aumento, en las proporciones de AA en las células tratadas con AA con 5ug/ml, 20ug/ml y 60ug/ml, en relación al control. Así mismo, se observó una variación en las proporciones de ácidos grasos de las diferentes familias de PUFAs; donde se observó un aumento en las proporciones de ácidos grasos de la familia ω -6 y una disminución en las proporciones de ácidos grasos de las familias ω -3 y ω -9, en células tratadas con AA en relación al control. Estos datos muestran que el AA exógeno es incorporado a las membranas celulares, modificando el perfil lipídico de las mismas.

Además, mediante el análisis morfológico de las diferentes líneas celulares, por microscopia de contraste de fase y con el colorante Negro SUDAN (marcador empírico de lípidos totales), se observaron inclusiones citoplasmáticas en forma de gotas de lípidos con ubicación perinuclear luego del tratamiento con AA (Figura III-1).

Tratamiento con AA	Acidos Grasos Saturados				Acidos Grasos Insaturados												
					n-5		n-7		n-9			n-6			n-3		
	16:0	18:0	20:0	24:0	14:1	16:1	18:1	20:1	20:2	18:2	18:3	20:4	18:3	20:3	20:5	22:6	22:5
ETOH	18,30	4,22	0,00	1,02	0,86	20,21	41,58	2,62	0,67	0,76	0,00	4,34	0,00	1,46	0,62	0,85	2,49
5ug/ml	17,55	4,70	0,00	5,90	0,18	15,71	35,27	2,19	0,47	0,53	0,11	13,60	0,12	1,06	0,79	0,67	1,14
20ug/ml	13,54	4,13	0,09	8,36	0,19	13,47	27,36	1,85	0,84	0,49	0,14	26,58	0,13	1,18	0,00	0,67	0,98
60ug/ml	16,60	4,96	2,01	8,21	0,20	15,12	31,88	0,47	0,44	0,49	0,00	17,27	0,22	0,62	0,00	0,56	0,94

Tabla III-1: El AA exógeno induce cambios en la composición de ácidos grasos en fosfolípidos de membrana.

Se determinó en células PANC-1, mediante cromatografía de gas los niveles relativos de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana. Los datos se expresan como porcentaje relativo entre ácidos grasos, determinados a partir de 6×10^6 células.

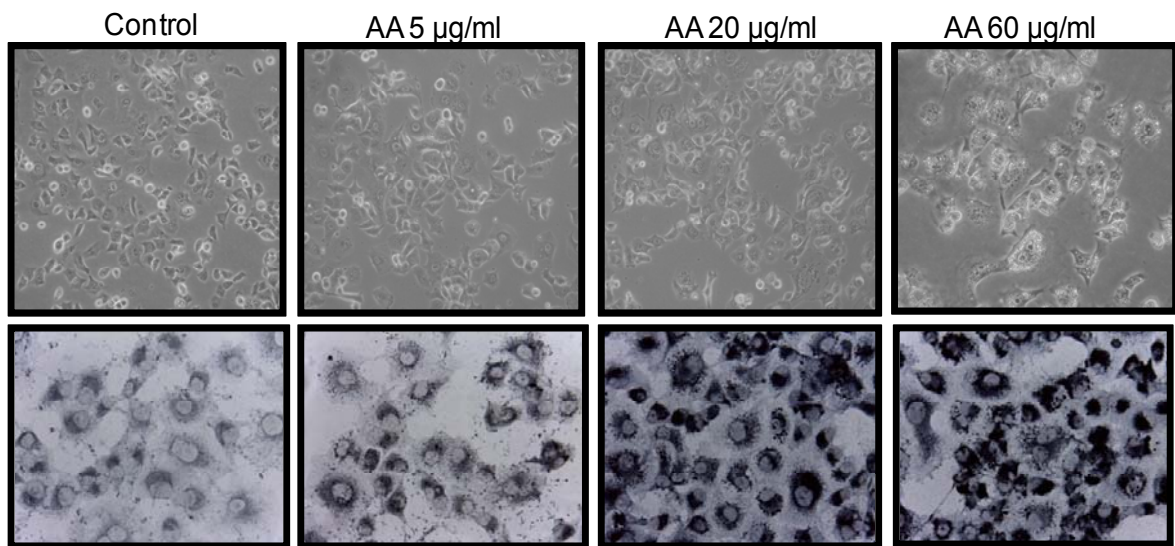


Figura III-1. El AA induce cambios morfológicos y acumulación de gotas de lípidos intracelulares.

El análisis mediante microscopía de contraste de fase (Panel Superior) y tinción con Negro Sudan (Panel Inferior), muestra acumulación de gotas de lípidos citoplasmáticos de ubicación perinuclear después del tratamiento con AA a diferentes concentraciones por 6 horas de tratamiento.

III-2. EL AA DISMINUYE EL CRECIMIENTO TUMORAL E INDUCE APOPTOSIS *IN VIVO*

Los resultados obtenidos del efecto del AA en el desarrollo tumoral en el modelo experimental *in vivo* del adenocarcinoma mamario murino LM3, de moderada capacidad metastásica, muestran que el AA inyectado en el lecho tumoral tiene un efecto antitumoral. En efecto, fue observado una reducción significativa en el volumen tumoral en animales tratados con AA en relación con el grupo control ($p < 0,05$). A partir de los 7 días post-tratamiento con AA el crecimiento del tumor se mantuvo en el tiempo y a partir de los 14 días post-tratamiento se observó una reducción significativa en el crecimiento tumoral en relación al grupo control ($p < 0,05$) (Figura III-2.A).

El análisis de los tejidos tumorales, para determinación de apoptosis *in situ*, mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis en los tumores tratados con AA que en el grupo control ($p < 0,05$). Normalizado el grupo control al 100 %,

el grupo tratado con AA mostró un porcentaje de apoptosis del 199,23 % ± 18,60 en relación al mismo. (Figura III-2.B).

Estos resultados muestran que el AA regula el crecimiento tumoral promoviendo la inducción de la muerte celular programada.

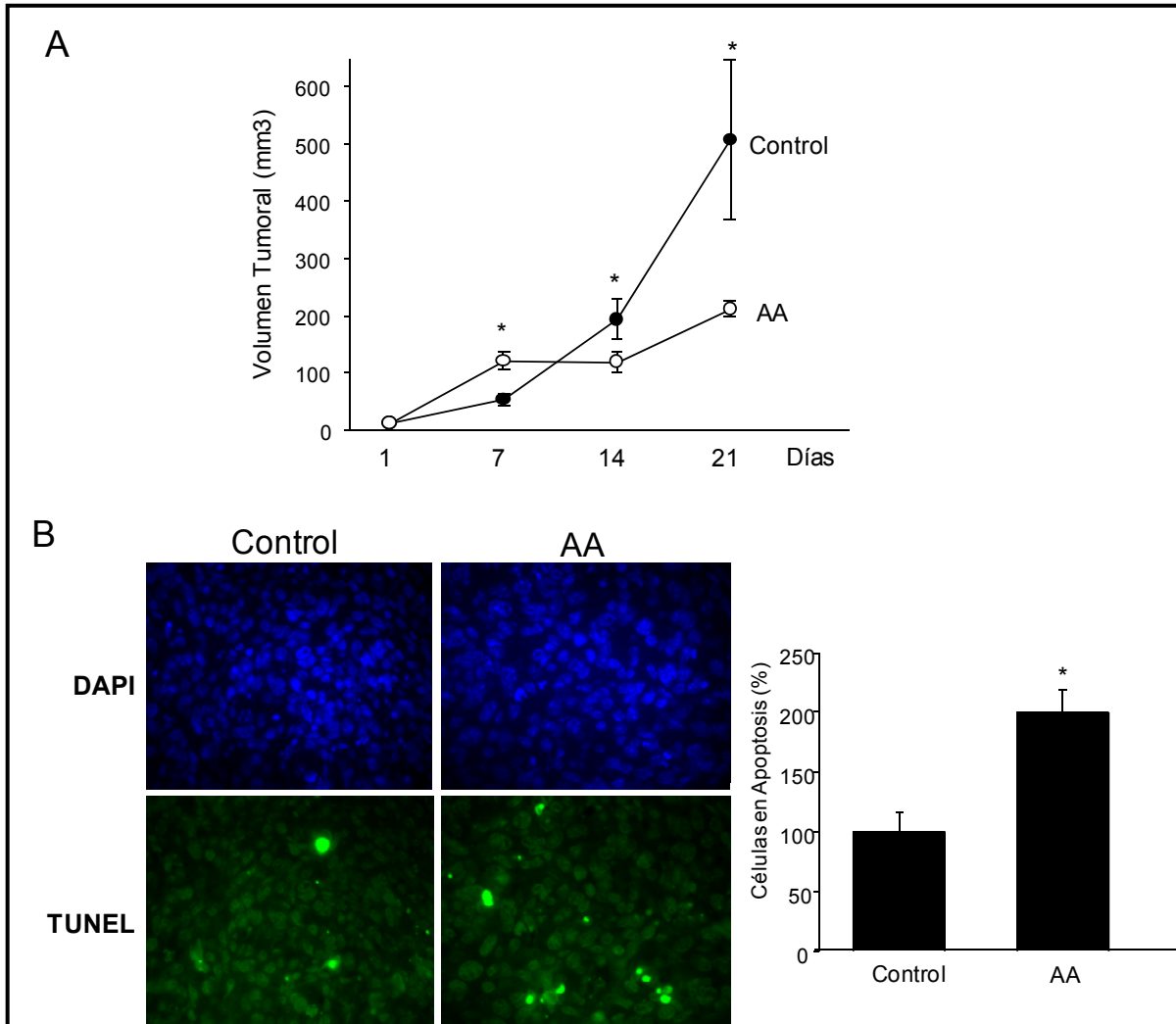


Figura III-2. El tratamiento con AA inhibe el crecimiento tumoral y la incidencia de metastastasis e induce apoptosis *in vivo*

A) Ratones BALB-C fueron inoculados con 1×10^6 células de la línea LM3 de adenocarcinoma mamario murino. El volumen del tumor fue medido en el grupo tratado con AA y el grupo control cada 7 días durante 21 días. Volumen Tumoral: $\text{Largo} \times \text{ancho}^2 / 2$. Media \pm ES. Grupo AA: n=10; Grupo Control: n=7. (*) $p < 0,05$ vs grupo control **B)** Evaluación de apoptosis en secciones de tejido tumoral LM3 por técnica de TUNEL (marcado con FITC). Cuantificación de tasa de apoptosis (número promedio de células TUNEL positivas por campo visual). Los experimentos fueron repetidos en 5 secciones de tumores y se contaron 10 campos al azar en cada tejido de manera ciega. Media \pm ES; n=5. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. (Panel Izquierdo). Imágenes de células TUNEL positivas en el núcleo se muestran marcadas de verde y las marcadas con DAPI de azul (Panel derecho), 200X.

III-3. EL AA DISMINUYE LA INCIDENCIA DE METÁSTASIS EN PULMÓN

El análisis de micro-metástasis en cortes de tejido pulmonar teñidos con H&E, mostraron que los pulmones de ratones, tratados con AA en el lecho tumoral, presentaron una disminución en la incidencia de metástasis. Se registró la presencia de metástasis en el 11% de los pulmones analizados del grupo AA a diferencia del grupo control en el cual se registraron micro-metástasis en un 57% de los pulmones. Estas diferencias fueron significativas entre los dos grupos así como también la presencia en relación a la ausencia de metástasis dentro del grupo AA ($p=0,0446$), lo que indica una modificación en el potencial metastático modulada por el AA (Figura III-3 a y b).

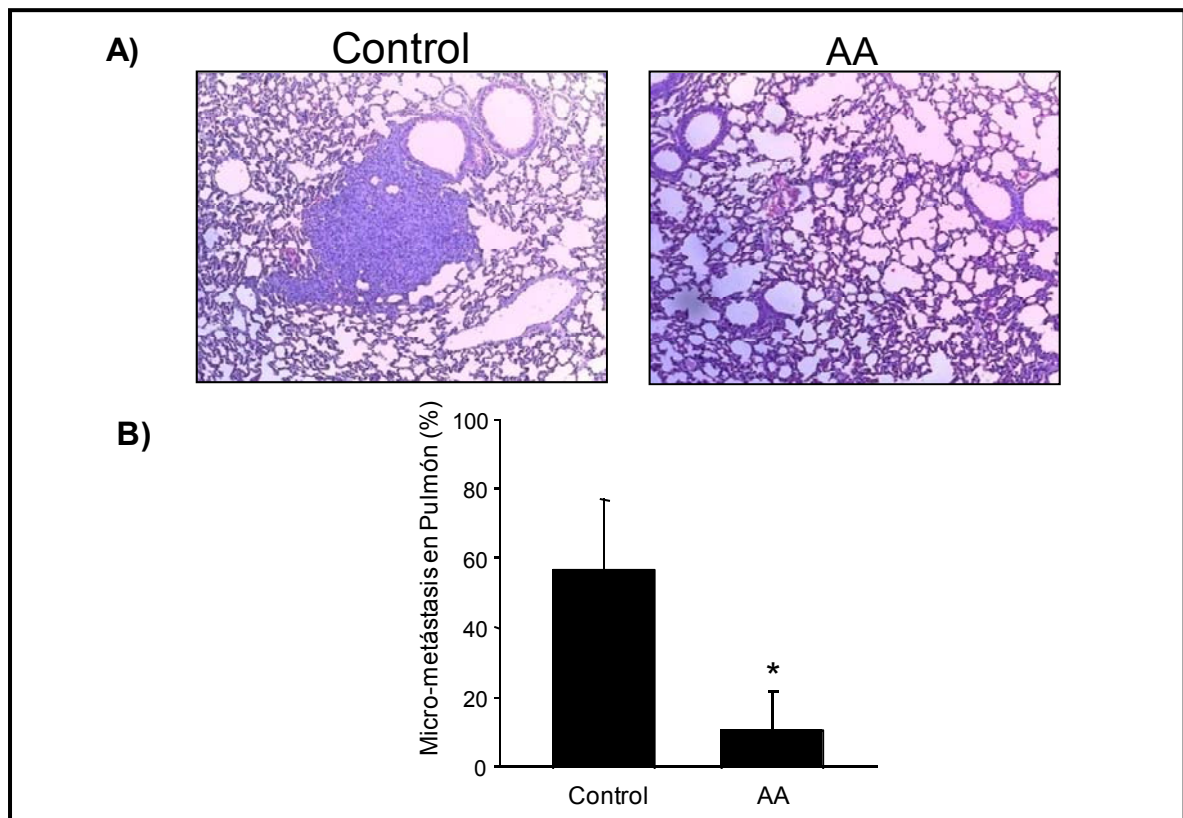


Figura III-3 El tratamiento con AA inhibe la incidencia de metastastasis en tejido pulmonar

A) Secciones de tejido pulmonar, coloreados con H&E fueron analizados bajo microscopio para detección de micrometastasis. Imágenes representativas de pulmones provenientes del grupo tratado con AA y Control coloreados con H&E, mostrando micrometastasis en pulmón Control, 200X. **B)** Frecuencias relativas expresadas como porcentajes de la incidencia de micro-metástasis. Grupo AA: $n=10$; Grupo Control: $n=7$. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

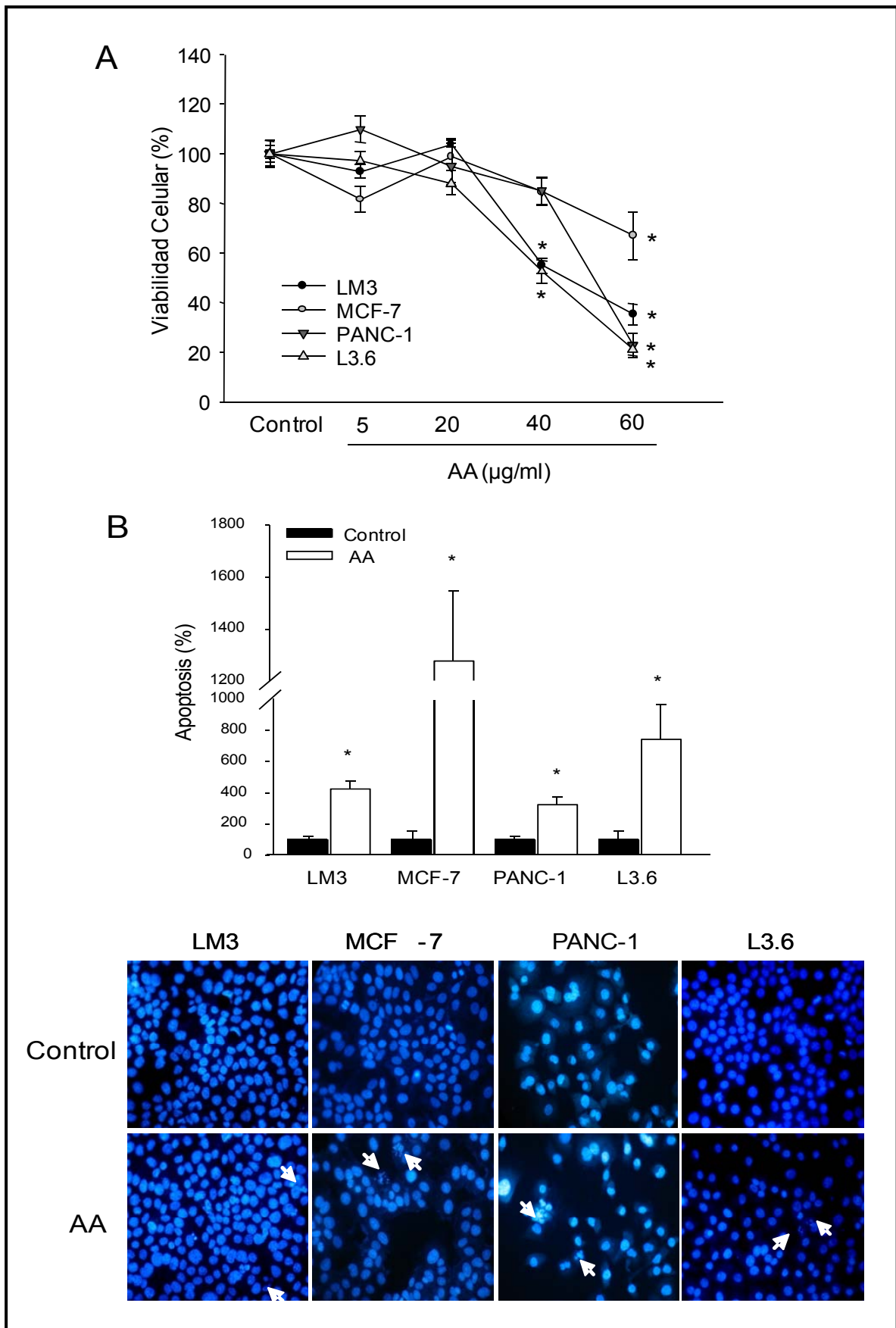
III-4. EL AA DISMINUYE LA VIABILIDAD CELULAR E INDUCE APOPTOSIS EN CÉLULAS CANCERÍGENAS DE MAMA Y PÁNCREAS

Para profundizar en el estudio del mecanismo por el cual el AA ejerce sus efectos citotóxicos y teniendo como control que este ácido graso es incorporado en las membranas celulares, utilizamos diferentes líneas celulares provenientes de adenocarcinomas humanos y murino las cuales fueron tratadas *in vitro* con concentraciones crecientes de AA.

Para determinación de viabilidad celular las células de mama MCF-7 y LM3 y de páncreas PANC-1 y L3.6 fueron tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes de AA, 5 ug/ml AA, 20ug/ml AA, 40ug/ml AA y 60 ug/ml AA y vehiculo control (etanol). En las líneas mamarias LM3 y MCF-7 y en las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1 y L3.6, el AA disminuyó la viabilidad celular de manera concentración dependiente. Estas células mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$) en la viabilidad celular en comparación con el control a partir de 60 $\mu\text{g/ml}$ de AA para MCF-7 y PANC-1, y 40 $\mu\text{g/ml}$ para LM3 y L3.6 (Figura III-4.A).

Para determinar si la citotoxicidad inducida por el AA exógeno fue debida a apoptosis, todas las líneas celulares se incubaron por 24 horas con 40 $\mu\text{g/ml}$ o 60 $\mu\text{g/ml}$ de AA y el vehiculo control. Consistentemente con los resultados obtenidos en el modelo *in vivo*, como se muestra en la Figura III-4.B mediante el análisis de fragmentación nuclear por fluorescencia, se observó que el AA induce un aumento significativo de la apoptosis ($p < 0,05$) a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ en las células LM3 y L3.6 y 60 $\mu\text{g/ml}$ en PANC-1 y MFC-7 respectivamente en relación al control, después de 24 horas de tratamiento.

A fin de confirmar los resultados anteriores se evaluó también apoptosis mediante el ensayo fluororimétrico de actividad de Caspasas, el cual mostró que el AA indujo un aumento significativo de la actividad de caspasas 3/7 a las 6 y 24 horas post-tratamiento ($p < 0,001$) (Figura III-4.C). Estos resultados muestran que el AA puede actuar como un compuesto citotóxico en líneas celulares de cáncer humanas y murina, siendo capaz de disminuir la viabilidad de las células cancerígenas e inducir la apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro*.



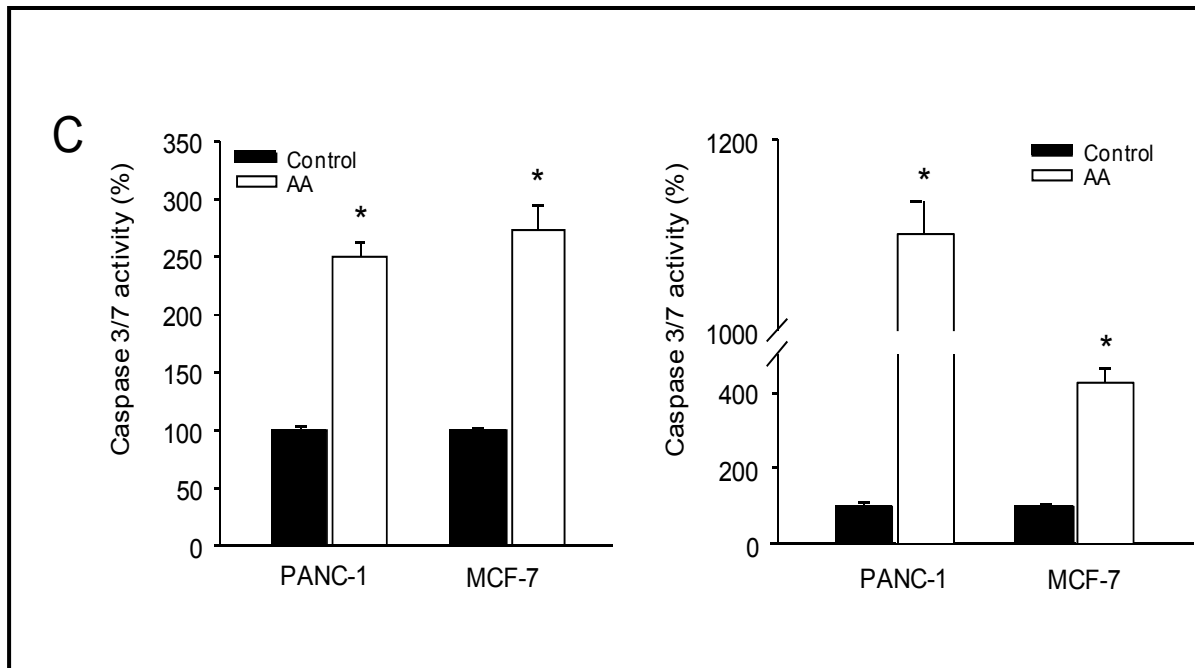


Figura III-4. El tratamiento con AA disminuye la viabilidad celular e induce apoptosis *in vitro*

A) Se determinó Viabilidad celular mediante ensayo fluorimétrico con el colorante Rezasurina para medir la capacidad metabólica de las células. Las células LM3, MCF-7, PANC-1 y L3.6 fueron tratadas con el vehículo control (etanol) o diferentes concentraciones de AA por 24 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **B)** La apoptosis analizada fue evaluada por marcación fluorescente con Hoechst 33258. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos (2.5×10^5 cel./pozo) y tratadas con AA por 24 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0.05$ vs grupo control. Las imágenes muestran núcleos fragmentados correspondientes a apoptosis (Flechas). **C)** La apoptosis fue evaluada por ensayo colorimétrico de Caspasas-3/7 (Apo-ONE®) en células MCF-7 y PANC-1 tratadas por 6 horas y 24 horas. Se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos. La señal fluorescente se midió a una longitud de onda de (485ex/527em). Media \pm ES; n=5. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

III-5. EL TRATAMIENTO CON AA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ANTI-APOPTOTICO BCL-2, BFL-1/A1 Y 41BB MEDIANTE REPRESIÓN DEL PROMOTOR

Los resultados anteriores mostraron que el AA disminuyó la viabilidad celular e incrementó la apoptosis, sin embargo poco se conoce acerca de la vía de señalización por la cual este PUFA induce dicha apoptosis. Por lo tanto, determinamos la expresión de ARNm de un grupo de genes anti-apoptóticos, BCL-2, BFL-1/A1 y 41BB, involucrados en la regulación de la muerte celular.

Como se muestra en la Figura III-5.A, el tratamiento con AA en células MCF-7 y PANC-1 por 3 y 6 horas, disminuyó los niveles de ARNm de BCL-2, BFL-1/A1 y 41BB comparado con el control. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los genes, a excepción de los niveles de 41BB en células MCF-7, en el cual se observó una leve disminución.

Luego, se analizó mediante ensayo reportero de luciferasa el efecto del AA en la regulación de la actividad transcripcional de estos genes anti-apoptóticos. En concordancia con los ensayos de expresión de ARNm, el AA disminuyó significativamente, a las 3 y 6 horas post-tratamiento, la actividad promotora de los genes BCL-2, BFL-1 y 41BB en relación al grupo control ($p < 0,05$), sugiriendo de este modo un mecanismo de regulación transcripcional de un grupo de genes involucrados en el control de la apoptosis modulados por el PUFA AA (Figura III-5.B).

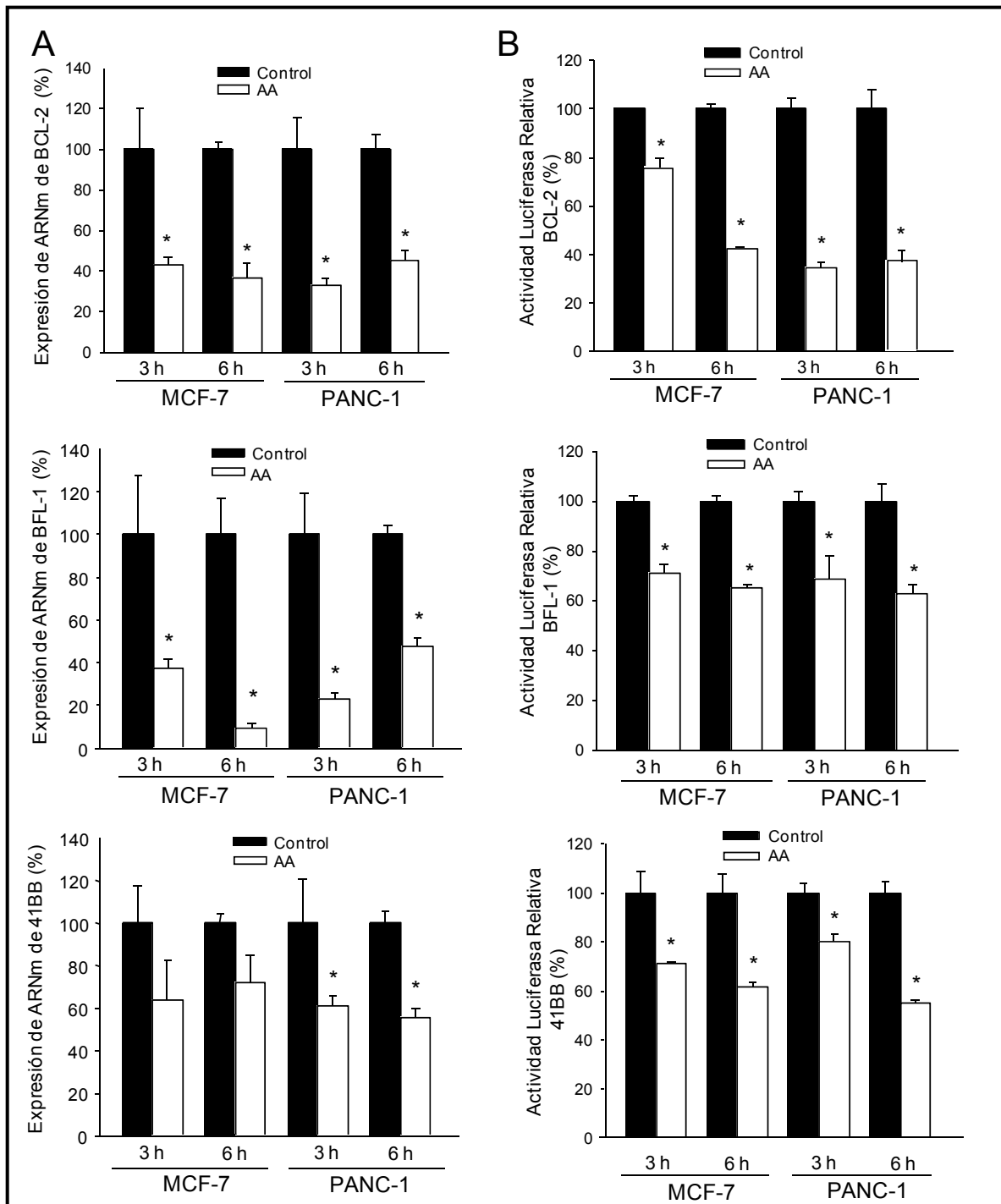


Figura III-5. El AA disminuye la expresión y actividad promotora de los genes anti-apoptóticos BCL-2, BFL-1 y 4-1BB

A) Los niveles de expresión de ARNm de los genes anti-apoptóticos BCL-2, BFL-1 y 41BB fue determinada por real time en células PANC-1 y MCF-7 tratadas con AA (60 µg/ml) o el vehículo control por 3 y 6 horas. Media ± SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **B)** Cambios relativos en la actividad Luciferasa en células MCF-7 y PANC-1 tranfectadas con los vectores reporteros BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB y subsecuentemente tratadas con AA (60 µg/ml) o el vehículo control por 3 y 6 horas. Media ± SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

III-6. EL AA DISMINUYE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD TRASCRIPTACIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ONCOGÉNICO GLI1

Habiendo observado que el AA regula un grupo de genes anti-apoptóticos y con el objeto de caracterizar el mecanismo de acción ejercido por este ácido graso, evaluamos la expresión del factor de transcripción GLI1. Como se describió anteriormente GLI1 es un conocido factor de transcripción oncogénico, implicado en el aumento de la proliferación celular y disminución de la apoptosis de células cancerígenas.

Por ello, se determinó la expresión a nivel proteico del factor de transcripción GLI1 por inmubloting. Como se observa en la Figura III-6.A, el tratamiento con AA a 60 µg/ml disminuyó la expresión de GLI en células PANC-1 de 1 a 6 horas post-tratamiento en relación al grupo control. Se utilizó como control la expresión de las proteínas α -actina y Hsp70, en las cuales no se observaron modificaciones en el tratamiento con AA en relación al control (Figura III-6.A).

Asimismo, mediante qRT-PCR observamos que el tratamiento con AA (60 µg/ml) disminuyó significativamente la expresión del ARNm del factor de transcripción GLI1 a las 1, 3 y 6 horas post-tratamiento en células PANC-1 y MCF-7 ($p < 0,05$). Este efecto se vio algo retardado en las células MCF-7 en relación a las PANC-1 pero finalmente se observó también una disminución significativa (Figura III-6.B).

Sumado a estos resultados observados sobre la modulación de la expresión de GLI1, se procedió a analizar su actividad transcripcional. Mediante el ensayo reportero de luciferasa observamos que el AA presentó un efecto modulador, disminuyendo significativamente la actividad transcripcional de GLI1 ($p < 0,05$), constatado esto por represión del vector reportero de luciferasa que contiene 8 sitios consecutivos de unión de GLI1 (GLI-Luciferasa), (Figura III-6.C).

Por lo tanto, estos resultados sugieren a GLI1 como un nuevo factor de transcripción posible de ser modificado por la acción del AA, así como también un posible mediador de la actividad transcripcional de los genes anti-apoptóticos.

Se realizaron además experimentos controles para determinar si el efecto del AA era directo sobre el factor de transcripción GLI1 o un efecto secundario a la muerte celular. Para ello se repitió el tratamiento con AA en presencia de un inhibidor de caspasas totales (Q-

VD-OPH). Se determinó en primer lugar, por medio de un ensayo reportero de luciferasa en células PANC-1 tranfectadas con el plásmido reportero GLI-LUC, que el AA (60 $\mu\text{g/ml}$) continuó disminuyendo significativamente la actividad de GLI1, aun cuando la actividad de caspasas había sido ya inhibida ($p < 0,05$). Estos resultados indican que el efecto del AA observado en la reducción de la actividad de GLI no es secundario a la muerte celular, sino que afecta directamente a GLI1 (Figura III-6.D).

A su vez, como control de este tratamiento con el inhibidor de caspasas totales se midieron los niveles apoptosis y de viabilidad celular. Mediante el ensayo fluorométrico de caspasas 3/7 en células PANC-1, se observó que el aumento significativo de la actividad de las caspasas 3/7 inducida por el tratamiento de AA (60 $\mu\text{g/ml}$) por 6 horas ($p < 0,05$), fue restablecido en presencia del inhibidor de caspasas Q-VD-OPH (Figura III-6.E). Por último, mediante la técnica de Rezasurina se observó que, el tratamiento con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas produjo una disminución significativa de la viabilidad celular, en células PANC-1 y MCF-7 respecto al control (sin inhibidor) ($p < 0,05$), de manera similar a lo que observamos en los experimentos de apoptosis (Figura III-6.F).

Estos resultados en conjunto muestran que el AA disminuiría directamente la expresión y actividad transcripcional de GLI1, lo que llevaría a una posterior disminución de la viabilidad celular y una inducción de la apoptosis, la cual se produce vía activación de las caspasas.

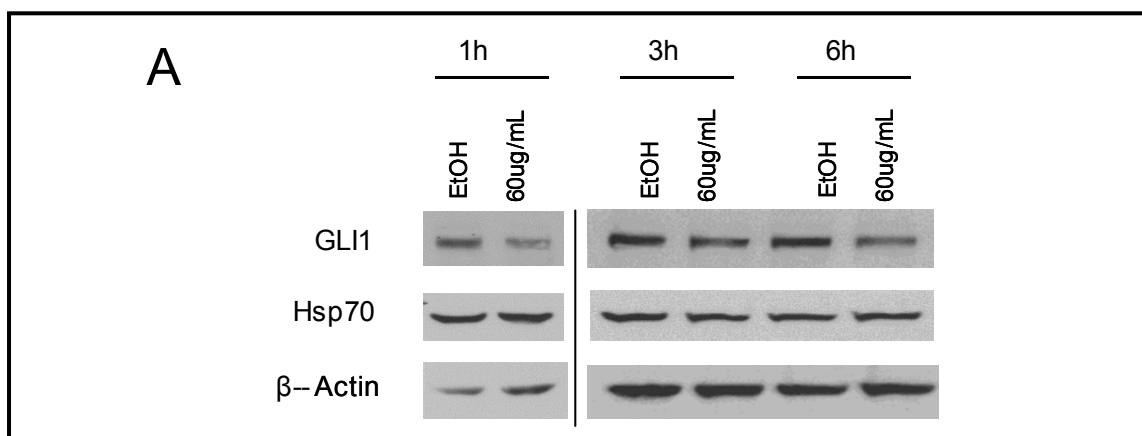


Figura III-6. El AA disminuye la expresión y la actividad transcripcional de GLI1

A) La expresión de la proteína GLI1 y de las proteínas controles Hsp70 y β -actina fue determinada por WB en células PANC-1 tratadas con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) o el vehículo control por 1, 3 y 6 horas.

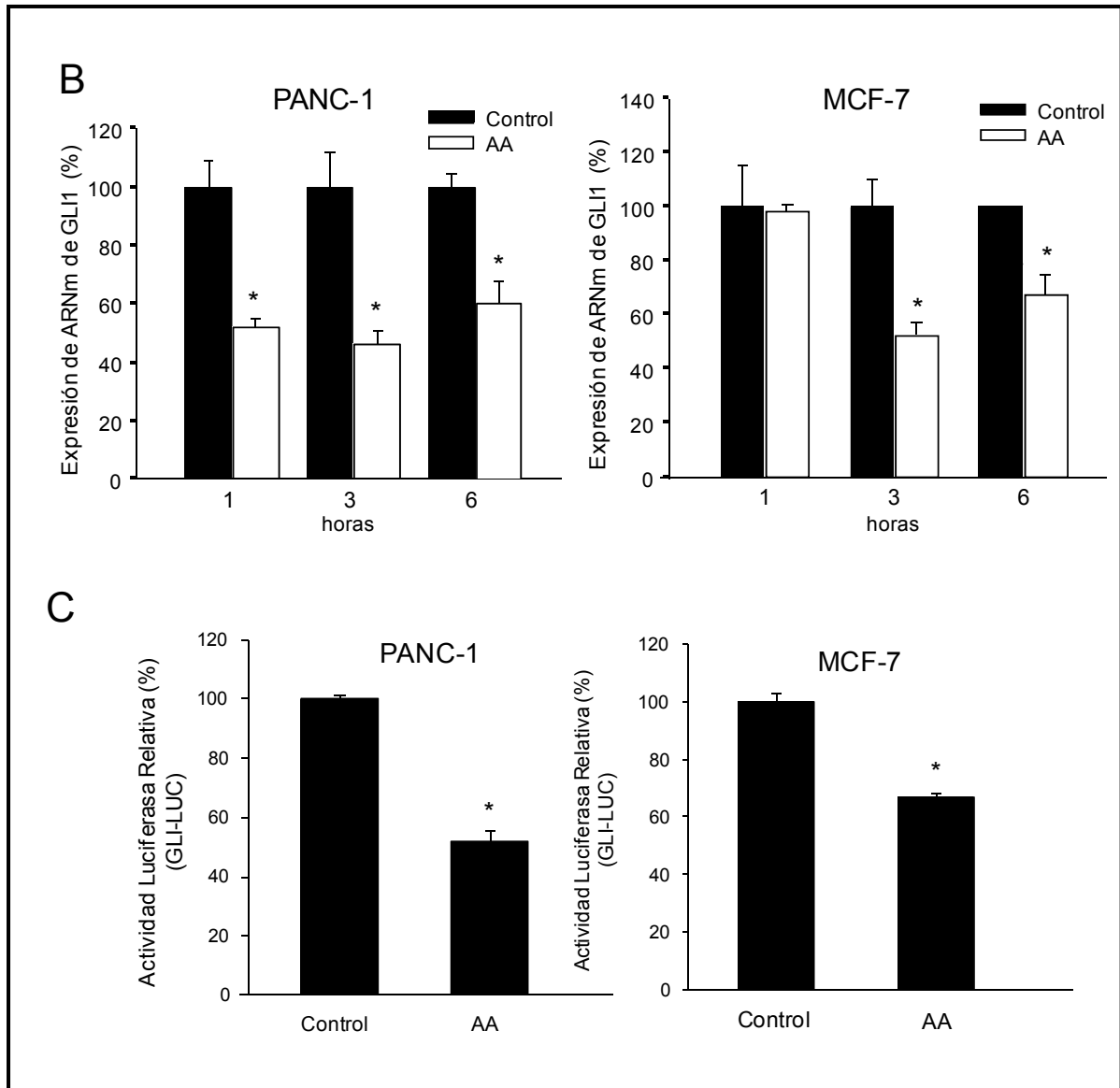


Figura III-6. El AA disminuye la expresión y la actividad transcripcional de GLI1

B) Los niveles de expresión de ARNm de GLI1 fueron determinados por RT-PCR en tiempo real en células PANC-1 y MCF-7 tratadas con AA (60 μ g/ml) o el vehículo control por 1, 3 y 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **C)** Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 tranfectadas con el vector reportero GLI-LUC y subsecuentemente tratadas con AA (60 μ g/ml) o el vehículo control por 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

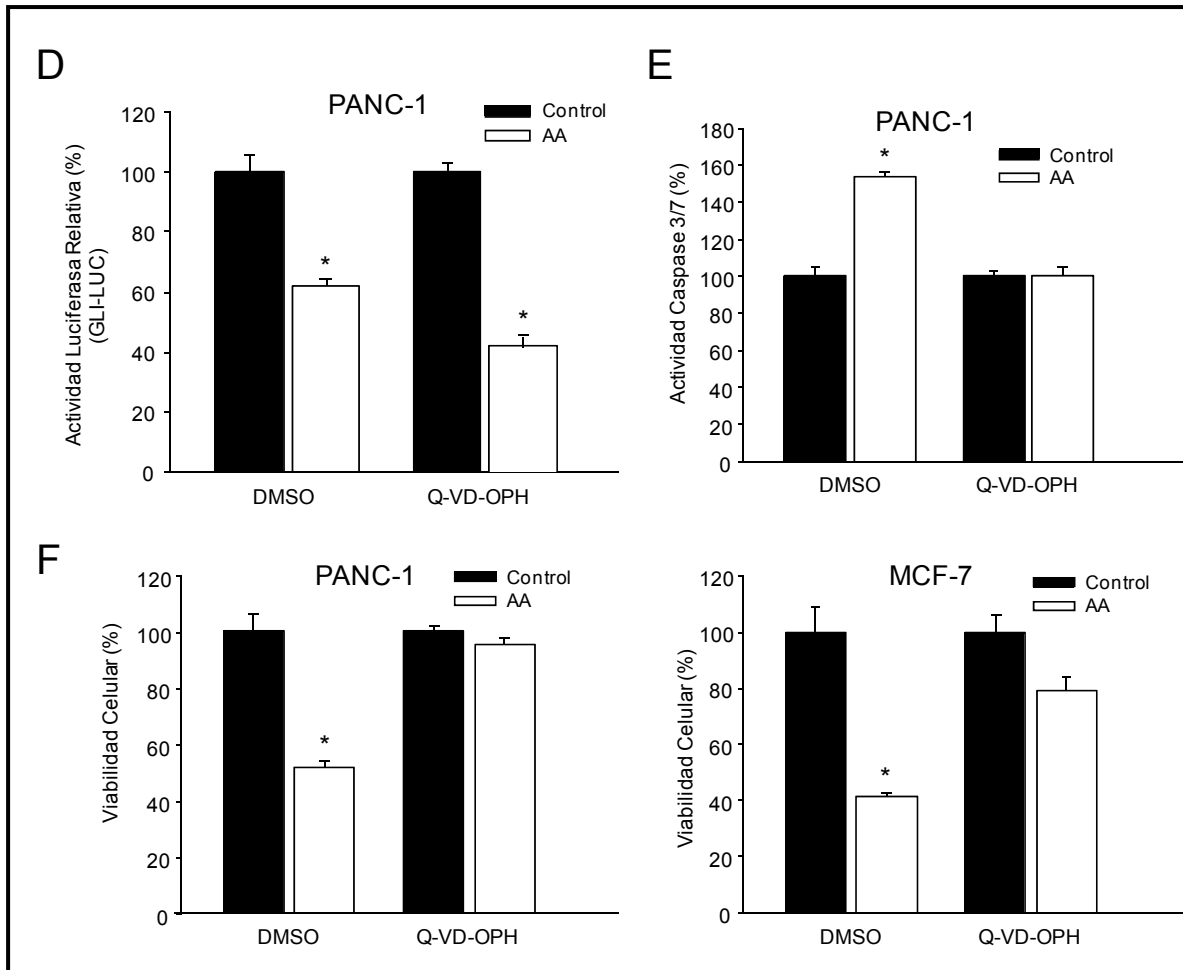


Figura III-6. El AA disminuye la expresión y la actividad transcripcional de GLI1

D) Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 tranfectadas con el vector reportero GLI-LUC y subsecuentemente tratadas con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH 20 μ M o con el vehículo control DMSO y co-tratadas con AA (60 μ g/ml) o el vehículo control por 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **E)** La apoptosis fue medida por ensayo de caspasas 3/7 en células PANC-1, tratadas al momento de siembra con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH 20 μ M o con el vehículo control DMSO. Luego fueron co-tratadas con AA (60 μ g/ml) o el vehículo control por 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **F)** La viabilidad celular fue determinada en células PANC-1 y MCF-7 usando ensayo de Resazurina. Las células fueron sembradas y tratadas con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH 20 μ M o con el vehículo control DMSO y posteriormente tratadas con AA 60 μ g/ml) o el vehículo control por 24 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

III-7. LA SOBREEXPRESIÓN DE GLI1 REVIERTE EL EFECTO DEL AA EN LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR Y ACTIVACIÓN DE GLI1

Siguiendo el diseño experimental y en relación a los resultados anteriores nos preguntamos si GLI era capaz de bloquear la muerte celular inducida por el AA así como la disminución de la actividad transcripcional del factor de transcripción GLI1.

Se determinó, mediante ensayo de apoptosis en células PANC-1 tranfectadas con el vector de expresión GLI1 y su correspondiente plásmido control (pcmv), que la sobreexpresión de GLI1 fue capaz de restablecer significativamente el efecto pro-apoptótico ejercido por el AA en la inducción de la actividad de caspasas 3/7 ($p < 0,05$), (Figura III-7.A).

De manera similar, en las células MCF-7 tranfectadas con el vector reportero GLI-LUC, la sobreexpresión de GLI1 revirtió el efecto pro-apoptotico del AA en la disminución de la actividad del factor de transcripción GLI1 (Figura III-7.B). El tratamiento por 3 horas restablece la actividad del factor de transcripción GLI1 a los niveles del control sin diferencias significativas con el mismo y el tratamiento con AA por 6 horas revierte este efecto siendo significativamente mayor que el control ($p < 0,05$).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la regulación negativa de GLI1 es uno de los requerimientos en la cascada de señalización de muerte celular inducida por el AA.

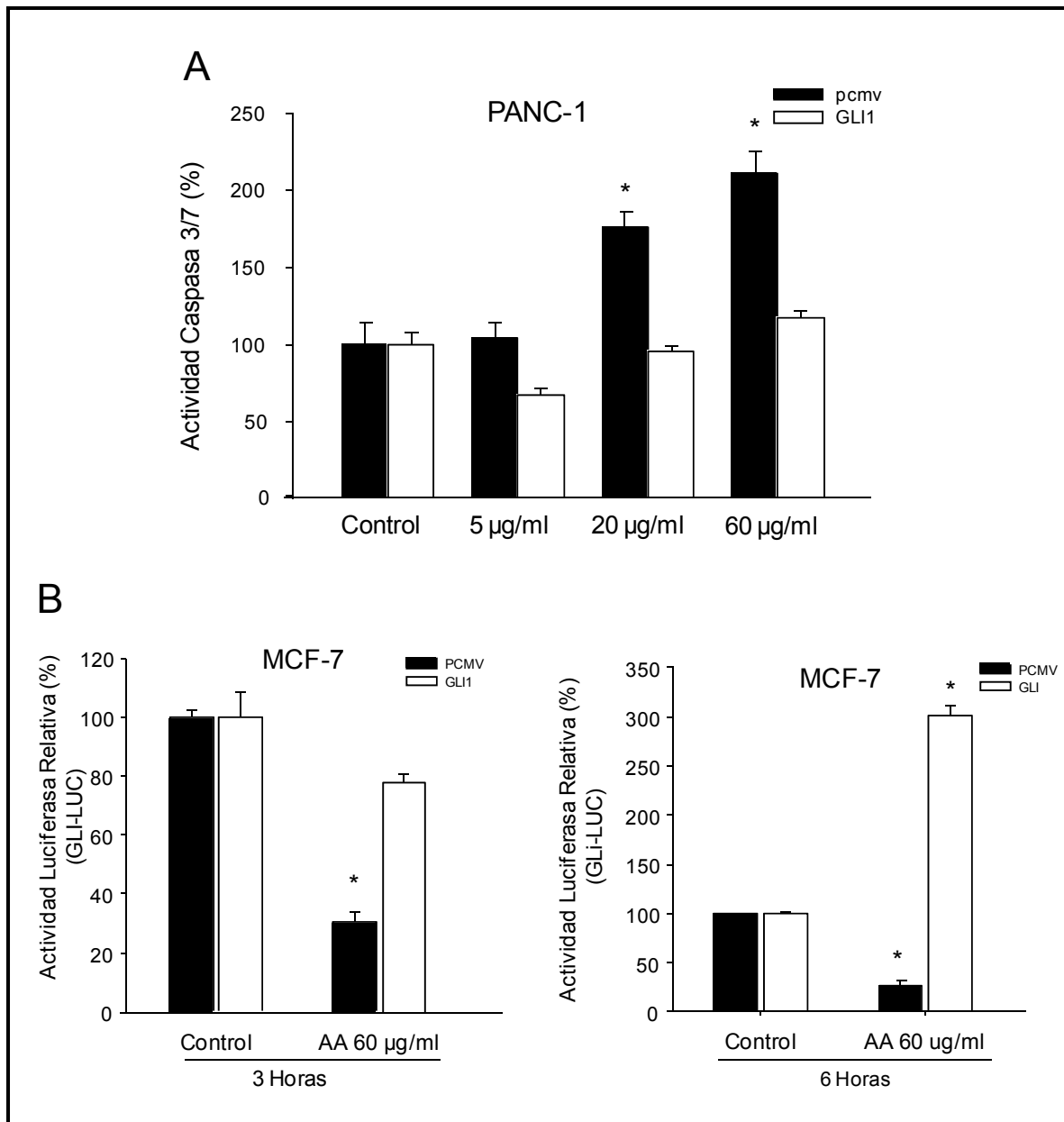


Figura III-7. GLI1 revierte el efecto de muerte celular y regulación negativa de la actividad de GLI1 inducida por el AA

A) Células PANC-1 fueron tranfectadas con el vector de expresión de GLI1 o el vector control PCMV. Después de 24 horas las células fueron tratadas con AA a una concentración creciente de 5-20-60 µg/ml o el vehículo control por 6 horas. Se determinó apoptosis con ensayo de Caspasas 3/7. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs vector control PCMV. B) Cambios relativos en la actividad Luciferasa en células MCF-7 co-tranfectadas con los vectores reporteros GLI-LUC y con los vectores de expresión GLI1 y vector control PCMV. Las células fueron tratadas con AA (60 µg/ml) o el vehículo control por 3 horas (Panel Izquierdo) y 6 horas (Panel derecho). Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs tratamiento control respectivo.

III-8. LAS PROTEÍNAS ANTIAPOPTÓTICAS BCL-2, BFL-1 Y 4-1BB SON GENES DIANA DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE GLI1

El mecanismo propuesto para GLI1 en el proceso cancerígeno y los objetivos de esta tesis, es la modulación que el mismo ejerce en la transcripción de genes específicos. Por lo tanto mediante un análisis de bioinformática inicial de las regiones promotoras de BCL-2, BFL-1 y 4-1BB promotor se identificaron diferentes sitios de unión candidatos del factor de transcripción GLI1 (G) (Figura III-8.A). Para definir entonces la función del factor de transcripción GLI1 en las regiones promotoras de los genes anti-apoptóticos Bcl-2, Bfl-1 y 41BB, se utilizó una combinación de ensayo reportero de luciferasa, ensayos de expresión y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

Como se muestra en la Figura III-8.B, mediante ensayo reportero de luciferasa en células MCF-7 y PANC-1, la sobreexpresión de GLI1 indujo un aumento significativo en la actividad de los promotores de los genes anti-apoptóticos BCL-2, BFL-1 y 41BB ($p < 0,05$).

Por otra parte, los estudios de expresión de GLI1 en células PANC-1, utilizando dos vectores de shARN independientes, que se sabe inhiben su expresión, se observó que la inhibición (knowdown) de GLI1 disminuyó significativamente la expresión del ARNm de los genes BCL-2, BFL-1 y 41BB con ambos shARN ($p < 0,05$), (Figura III-8.C).

Con el fin de ahondar más estos resultados, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina, donde se confirmó la unión del factor GLI1 endógeno a las regiones situadas por encima del primer intrón de los genes BCL-2, BFL-1 y 41BB. Estos datos se muestran en la Figura III-8.D y E a través de la determinación por ensayo de PCR normal y por PCR cuantitativa. Se confirmaron así la unión de GLI1 en la región comprendida entre los -2696 pb y -2487 pb por encima del primer intron de BCL-2; en la región entre -448 pb y -125 pb del primer intron de BFL-1 y dos sitios de unión de GLI en las regiones localizadas entre los -1064 pb y -555 pb y entre los -555 pb y -24 pb. Determinamos a su vez por PCR cuantitativa que la inmunoprecipitación con GLI1 en estas regiones para todos estos genes es significativamente mayor que su respectivo control (IgG).

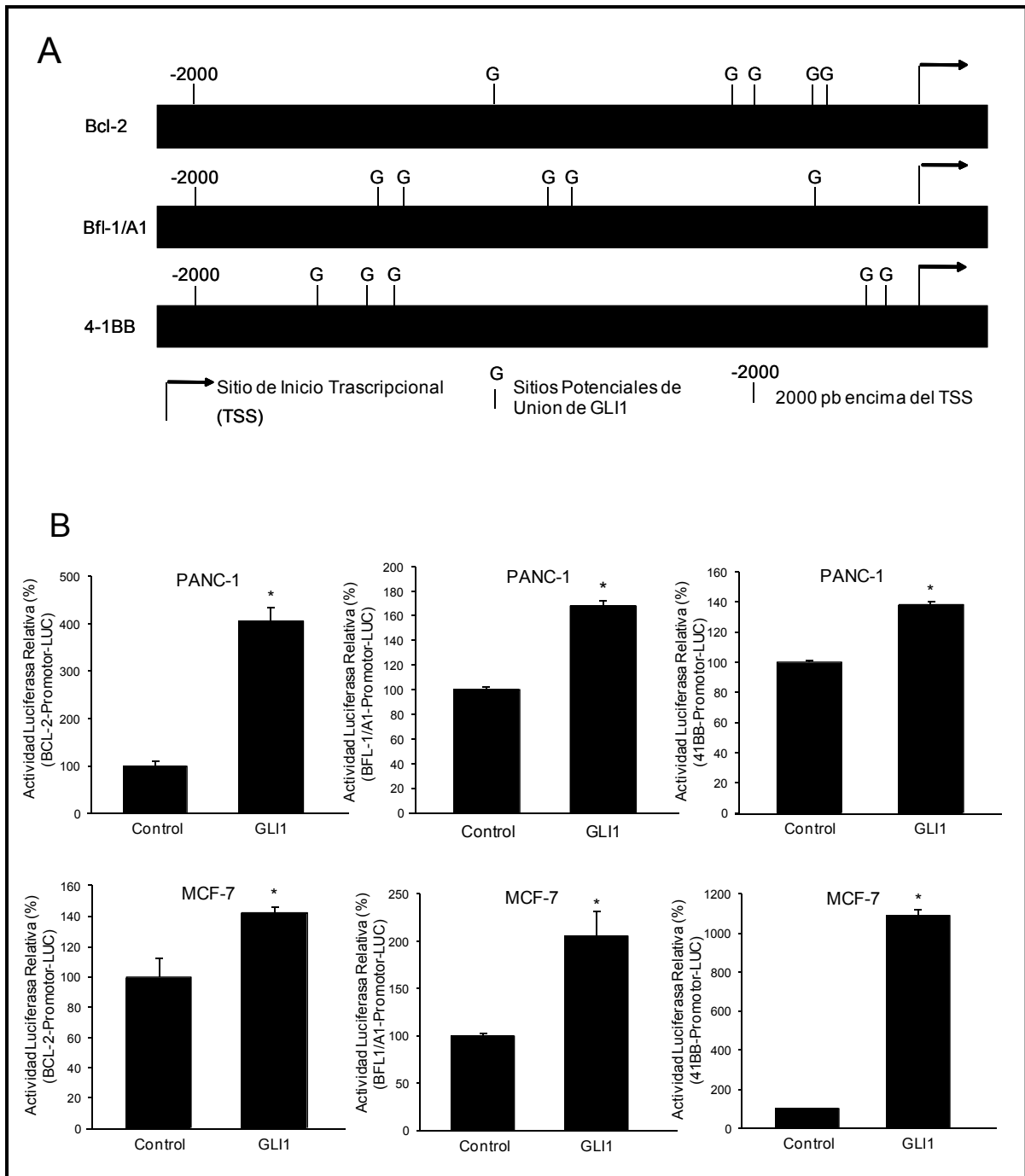


Figura III-8. Las proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB son genes target de GLI1

A) Análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes anti-apoptóticos BCL-2, BFL-1 y 4-1BB con sitios de unión candidatos de GLI (G); (SIT=Sitio de Inicio transcripcional). **B)** Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 co-transfectadas con los vectores reporteros de los promotores de los genes anti-apoptóticos genes (BCL-2-Luc, BFL-1/A1-Luc and 4-1BB- Luc) y el vector de expresión GLI1 o el vector control PCMV. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs PCMV control.

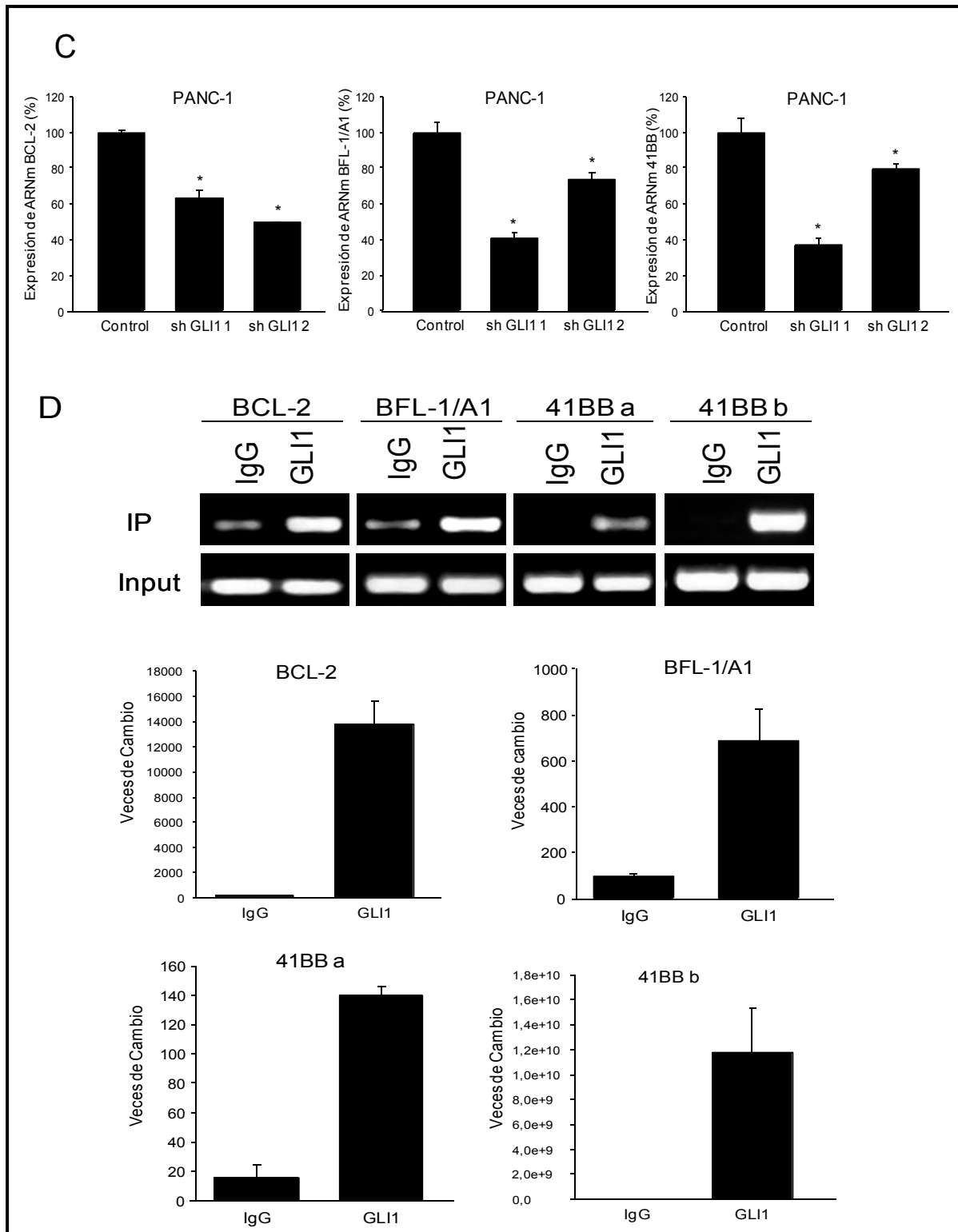


Figura III-8. Las proteínas anti-apotóticas BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB son genes target de GLI1

C) Células PANC-1 fueron tranfectadas con dos vectores shARN diferentes para GLI1 y un vector control (NT) para determinar los niveles de expresión de ARNm de los genes BCL-2, BFL-1 y 4-1BB por PCR en tiempo real. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs NT control. D) Lisados de células

PANC-1 y el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) fueron llevados a cabo usando el anticuerpo de GLI1 o el anticuerpo IgG control. PCR convencional (panel superior) y PCR en tiempo real (panel inferior) fueron desarrolladas usando un set específico de primers como se indica en materiales y métodos para las regiones promotoras de BCL-2, BFL-1/A1 y 4-1BB. Se observan uniones positivas de GLI1 endógeno en las regiones BCL-2: -2696 pb a -2487pb, BFL-1: -448 pb a -125 pb, 41BB: (a) -1064 pb a -555 pb y (b) -555 pb a -24 pb por encima del primer intron.

III-9. EL AA REPRIME LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE GLI1 MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD REPRESORA DEL FACTOR DE TRASCRIPTIÓN NFATc1 Y DISMINUCIÓN DE H3-K14-AC

Los resultados anteriores descriptos arriba mostraron que la actividad y expresión de GLI1 es modulada por el AA en líneas celulares de cáncer de mama y páncreas. Por lo tanto, para determinar el mecanismo de acción corriente arriba (up stream) por el cual el AA regula al factor de transcripción oncogénico GLI1, se utilizaron a continuación una combinación de ensayos transcripcionales y de inmunoprecipitación de cromatina.

Como se observa en la Figura III-9.A, mediante ensayo reportero de luciferasa usando un vector que contiene la región promotora GLI1, observamos en células MCF-7 y PANC-1 que el AA disminuyó significativamente la actividad del promotor de GLI1 a los 30 minutos y 6 horas post-tratamiento respecto al control ($p < 0,05$). Ello indica que la disminución de la expresión de GLI1 se debe a una modulación de la actividad transcripcional de su gen.

Además, como experimento control se determinó, por ensayo de luciferasa en las células MCF-7 y PANC-1 tranfectadas con el vector reportero, que contiene la región promotora de GLI1, que incluso aún, en condiciones de inhibición de la actividad total de las caspasas con el inhibidor Q-VD-OPH, el tratamiento con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) continúa disminuyendo significativamente la actividad del promotor de GLI1 ($p < 0,05$), (Figura III-9.B).

Para ampliar el análisis de la región promotora de GLI1, se realizaron estudios reporteros de luciferasa, utilizando el vector del promotor GLI1 de longitud completa y dos

vectores con deleciones en la región promotora (-750-GLI1-Promotor-Luc y -350-GLI1-Promotor-Luc). Este experimento mostró que el AA (60 µg/ml), indujo una disminución significativa en la actividad del promotor de GLI1 como habíamos observado y siguió teniendo un efecto represor significativo sobre las regiones -750 pb y -350 pb (up stream) del promotor ($p < 0,05$), lo que señala a esta región del gen como un área candidata en la modulación de la actividad transcripcional del promotor de GLI1 (Figura III-9.C).

Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos, se realizó un análisis bioinformático inicial del promotor de GLI1 dentro de los -350 pb up stream del sitio de inicio transcripcional utilizando la base de datos de los programas TESS y Tfsitescan. A partir del mismo, identificamos al factor de transcripción NFATc1 como un represor candidato, mediador de la inhibición del promotor GLI1 en las células cancerosas por efecto del AA. A partir de este análisis, se procedió a evaluar mediante ensayos reporteros de luciferasa el efecto del factor de transcripción NFATc1 sobre el promotor de GLI1. Estos experimentos indicaron que la sobreexpresión de NFATc1 induce una disminución significativa en la actividad del promotor de GLI1 tanto en células PANC-1 como en células MCF-7 ($p < 0,05$), (Figura III-9.D).

Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP), en las células PANC-1, se confirmó la unión de NFATc1 endógeno a la región situada -350 pb por encima del primer intrón, así como la inducción de un aumento significativo de la unión de esta proteína luego del tratamiento por 6 horas con AA (60 µg/ml) respecto al grupo control. En conjunto estos resultados proporcionan una fuerte evidencia bioquímica, indicativas de que GLI1 sería un nuevo gen diana del factor de transcripción NFATc1, el cual actúa como un represor modulado por la acción del AA en las células cancerosas (Figura III-9.E).

A su vez, por medio de este ensayo, se determinó en células PANC-1, que el tratamiento con AA (60 µg/ml), por 6 horas, indujo una disminución de la acetilación de Histona 3, acetiladas en el residuo Lisina 14 (H3-K14-Ac), en la región -350 pb por encima del sitio de inicio transcripcional, lo cual se correlaciona con la represión transcripcional de GLI1 inducida por el AA a través de la activación de NFATc1 (Figura III-9.F).

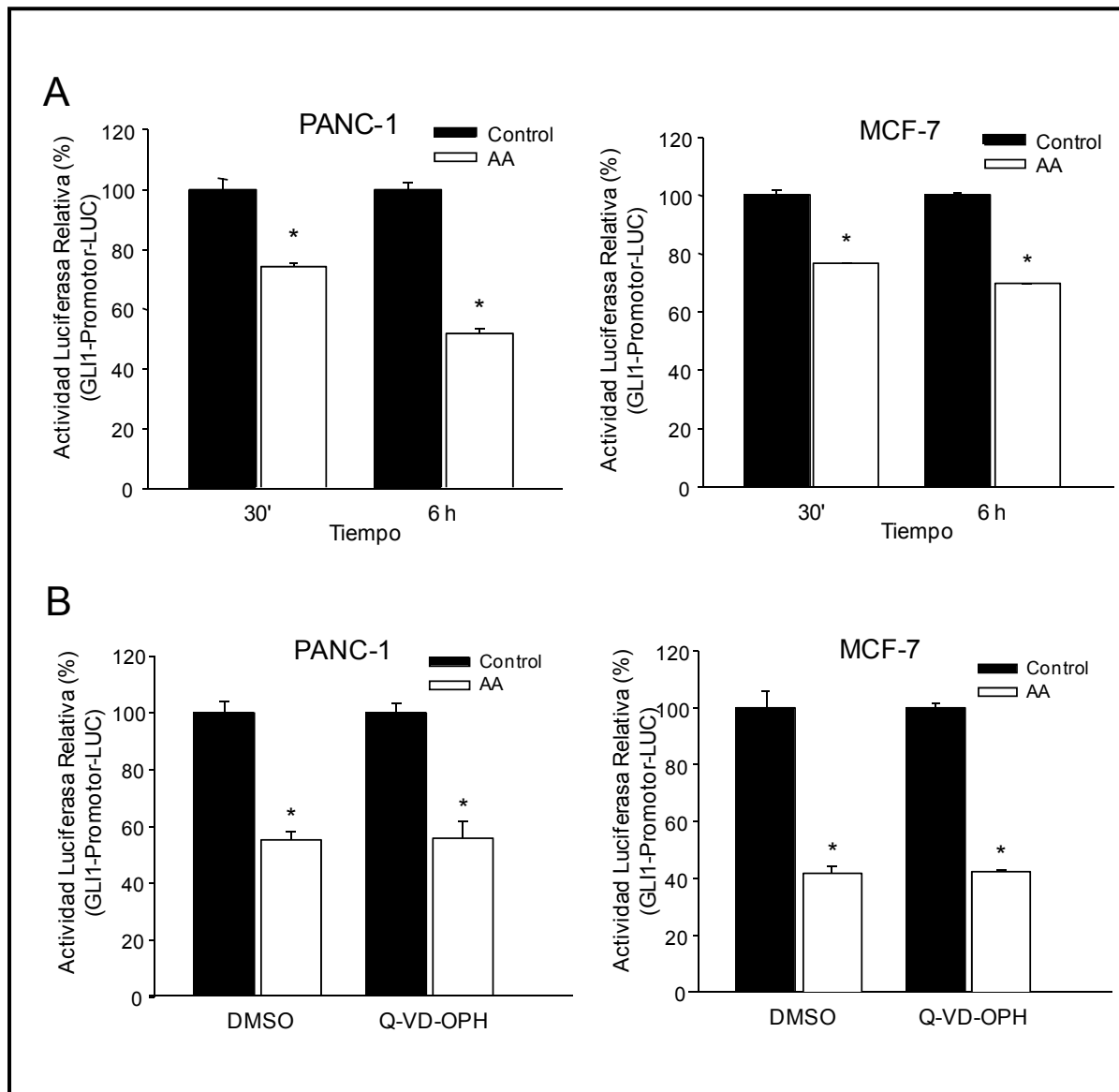


Figura III-9. El AA reprime la actividad del promotor de GLI1 en células cancerígenas por inducción de NFATc1

A) Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC y subsecuentemente tratadas con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) o el vehículo control por 30 minutos y 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control. **B)** Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC y subsecuentemente tratadas con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPH 20 μM o con el vehículo control DMSO y co-tratadas con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) o el vehículo control por 6 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

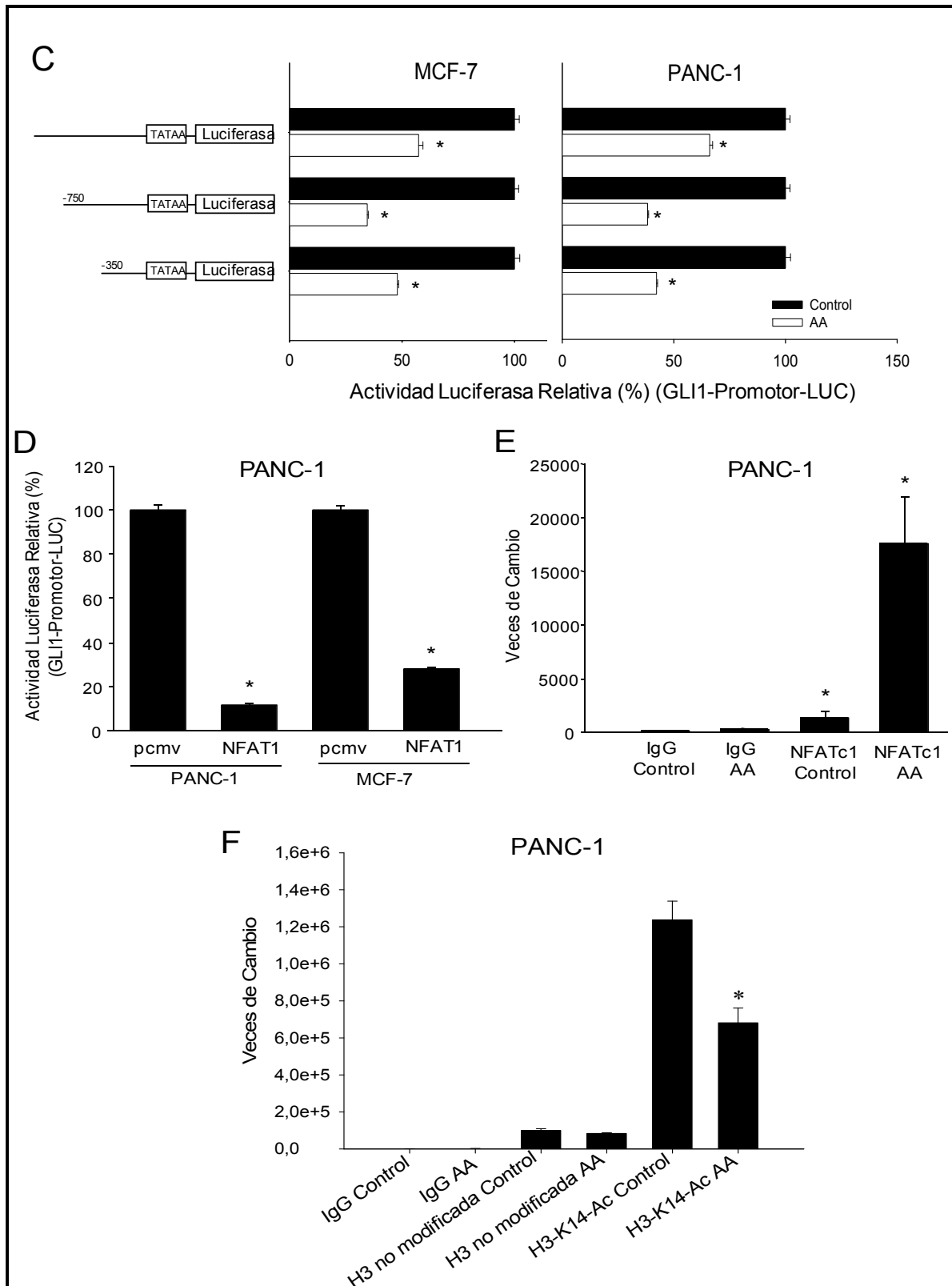


Figura III-9. El AA reprime la actividad del promotor de GLI1 en células cancerígenas por inducción de NFATc1.

C) Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC de longitud completa o con el vector reportero del promotor de GLI con deleciones (-750-GLI1-Promotor-LUC y -350- GLI1-Promotor-

LUC). Las células fueron luego tratadas con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) o el vehículo control por 30 minutos y 6 horas. Media \pm SE; $n=3$. (*) $p<0,05$ vs grupo control. **D)** Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 y MCF-7 co-tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC y el vector de expresión NFATc1 o el vector control PCMV. Media \pm SE; $n=3$. (*) $p<0,05$ vs PCMV control. **E)** El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) fue llevado a cabo en células PANC-1 pre-tratadas con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) o el vehículo control por 6 horas; se inmunoprecipitó con los anticuerpos de NFATc1 o IgG control. Se llevó a cabo una PCR en tiempo real, usando un set específico de primers indicado en materiales y métodos, para la región -350 pb por encima del sitio de inicio transcripcional del promotor de GLI1. Media \pm SE; $n=3$. (*) $p<0,05$ vs grupo control. **F)** Se realizó el mismo protocolo que se detalla en E) e inmunoprecipitando con los anticuerpos de H3 total, H3-K14-Ac e IgG control.

III-10. LAS VÍAS METABÓLICAS DEL AA PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE GLI1

Se profundizó en el mecanismo de acción ejercido por el AA sobre el promotor de GLI1 en relación a la naturaleza de la señal responsable del efecto del AA sobre la regulación transcripcional observada, considerando que el AA es uno de los PUFAs más relevante en la composición de las membranas celulares. En este contexto, teniendo en cuenta que el AA actúa, como principal sustrato de enzimas oxigenasas generadoras de eicosanoides y en procesos de oxidación no enzimática, según la disponibilidad del ácido graso para el subsecuente metabolismo, se determinaron, a partir de los cambios en el perfil de ácidos grasos de las membranas celulares observados, la activación de sus vías metabólicas de oxidación lipídica.

Para determinar, si el AA, como sustrato enzimático de las vías de las Lipoxigenasas (LOXs), Cicloxigenasas (COXs) y de la vía de oxidación no enzimática, indujo la activación de las mismas, se identificó y cuantificó en células MCF-7, LM3 y PANC-1, la liberación de sus metabolitos derivados. El añadido exógeno de AA, 60 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas, indujo un aumento significativo en la formación de hidroperóxidos totales ($p<0,05$), (Figura III-10.A- Panel Izquierdo). A su vez, este tratamiento provocó un aumento significativo en la actividad de la enzima gama-glutamyl-transpeptidasa, indicadora de peroxidación lipídica intracelular ($p<0,05$), (Figura III-10.A- Panel Derecho).

Por otra parte, el tratamiento con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas indujo una activación de las vías metabólicas enzimáticas COXs y LOXs. El metabolito 12-HHT, marcador de actividad COXs, aumentó significativamente en las células PANC-1 ($p < 0,05$). En células MCF-7 y LM3 se observó un aumento en la síntesis de este metabolito aunque no presentó diferencias significativas. En cuanto a los derivados de la enzimas LOXs, en células PANC-1 el AA (60 $\mu\text{g/ml}$), indujo un aumento de los metabolitos 15-HETE (15-LOX), 12-HETE (12-LOX) y 5-HETE (5-LOX), siendo significativo el aumento de 12-HETE ($p < 0,05$). En las células MCF-7 y LM3 se observó un aumento significativo en todos los metabolitos anteriormente descritos ($p < 0,05$), (Figura III-10.B). Estos resultados indican que el AA exógeno es incorporado en las membranas celulares, como se mostró anteriormente y que posteriormente es en parte utilizado como sustrato de una activa oxidación enzimática y no enzimática. Por lo que, surgió la necesidad de evaluar si estos derivados podrían también estar involucrados en la modulación del factor de transcripción GLI1 en el proceso de muerte celular inducida por el AA.

Para ello, utilizando el ensayo reportero de luciferasa se determinó el efecto del AA sobre la actividad del promotor de GLI1 en presencia de diferentes antioxidantes e inhibidores específicos de las vías LOXs y COXs. Se observó en células PANC-1 tranfectadas con el vector (GLI1-Promotor-LUC), que la disminución de la actividad del promotor inducida por el AA (60 $\mu\text{g/ml}$) por 6 horas, es revertida en presencia de los antioxidantes de amplio espectro, como la N-acetyl-cisteína (250 μM) y el L-Glutatión (250 μM), indicando que estos hidroperóxidos estarían involucrados en las vías de señalización de muerte inducida por el AA (Figura III.11.A).

Se utilizó además un ensayo reportero de luciferasa, en células PANC-1 tranfectadas con el vector GLI1-Promotor-LUC, para determinar el efecto del AA sobre GLI1 en presencia de los inhibidores específicos de las vías metabólicas enzimáticas del AA. En la FIGURA III-10.B, se observa que el tratamiento con AA (60 $\mu\text{g/ml}$) por 6 horas, indujo una disminución en la actividad del promotor de GLI1 la cual persiste en presencia del inhibidor de Lipoxigenasas (12-LOX, 15-LOX y 5-LOX), el Acido Nordihidroguaiarético (NDGA, 50 μM). A su vez, el NDGA a una concentración de 100 μM , con la cual se induce la inhibición de las enzimas Lipoxigenasas y Cicloxigenas conjuntamente, inhibió mayormente la actividad del promotor de GLI1. Por otra parte, en presencia inhibidores más específico de la actividad Cicloxigenasas, Ibuprofeno 15 μM e Indometacina 0,65 μM , se observa que se restableció significativamente la actividad del promotor de GLI1 a los

niveles del control (Figura III.11.B). Observamos además dentro del grupo tratado con AA que en presencia de estos inhibidores existe actividad significativa mayor en relación al tratamiento sin inhibidor ($p < 0,05$).

Estos resultados muestran en conjunto que analizando el metabolismo del AA, los productos oxidados de la vía no enzimática y la vía de las COXs, en conjunto podrían ser en parte responsables de la regulación negativa de GLI1 inducida por el AA.

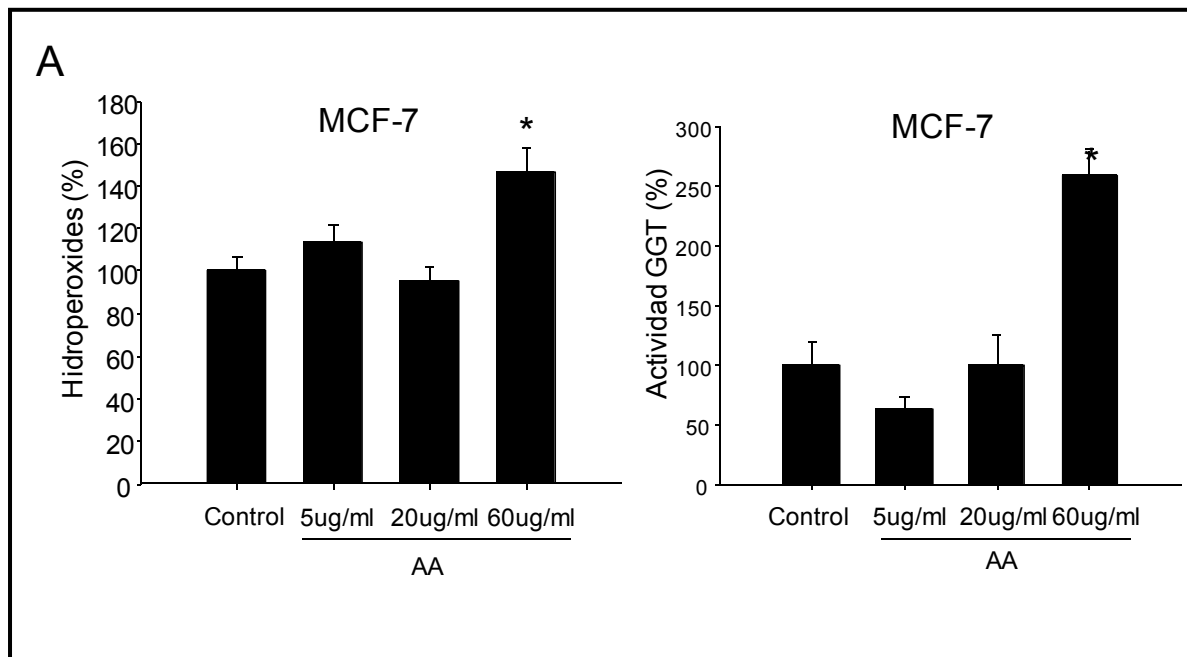


Figura III-10. El AA exógeno activa sus vías metabólicas de oxidación lipídica

A) Análisis de oxidación lipídica no enzimática mediante la técnica de “Xilenol Orange” (XO) (Panel Izquierdo) y actividad γ -Glutamil Transpeptidasa (GGT) (Panel Derecho), en células MCF-7 tratadas con AA AA (60 μ g/ml) o el vehículo control por 24 horas. Media \pm SE; n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

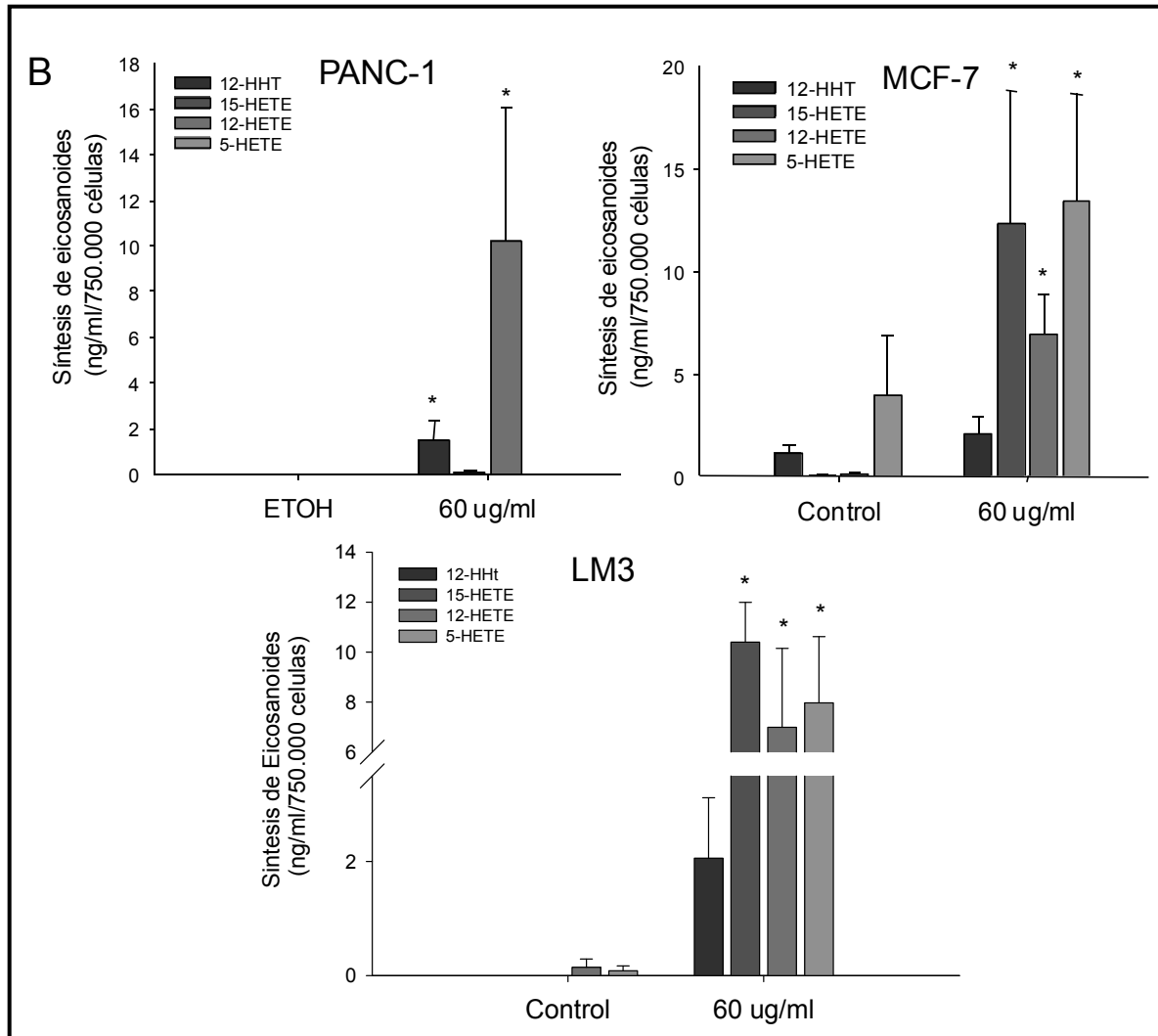


Figura III-10. El AA exógeno activa sus vías metabólicas de oxidación lipídica

B) Determinación mediante HPLC de oxidación lipídica enzimática en células MCF-7, PANC-1 y LM3 fueron tratadas con AA (60 µg/ml) por 24 horas. Se analizó la síntesis y liberación de eicosanoides de las enzimas 5-LOX (5-HETE), 12-LOX (12-HETE), 15-LOX (15-HETE) y COXs (12-HHT). Los datos se expresan como ng de eicosanoides/ ml de medio/ 750.000 células. Media ± SE; PANC-1 n=3; MCF-7 n=6-8; LM3 n=3. (*) $p < 0,05$ vs grupo control.

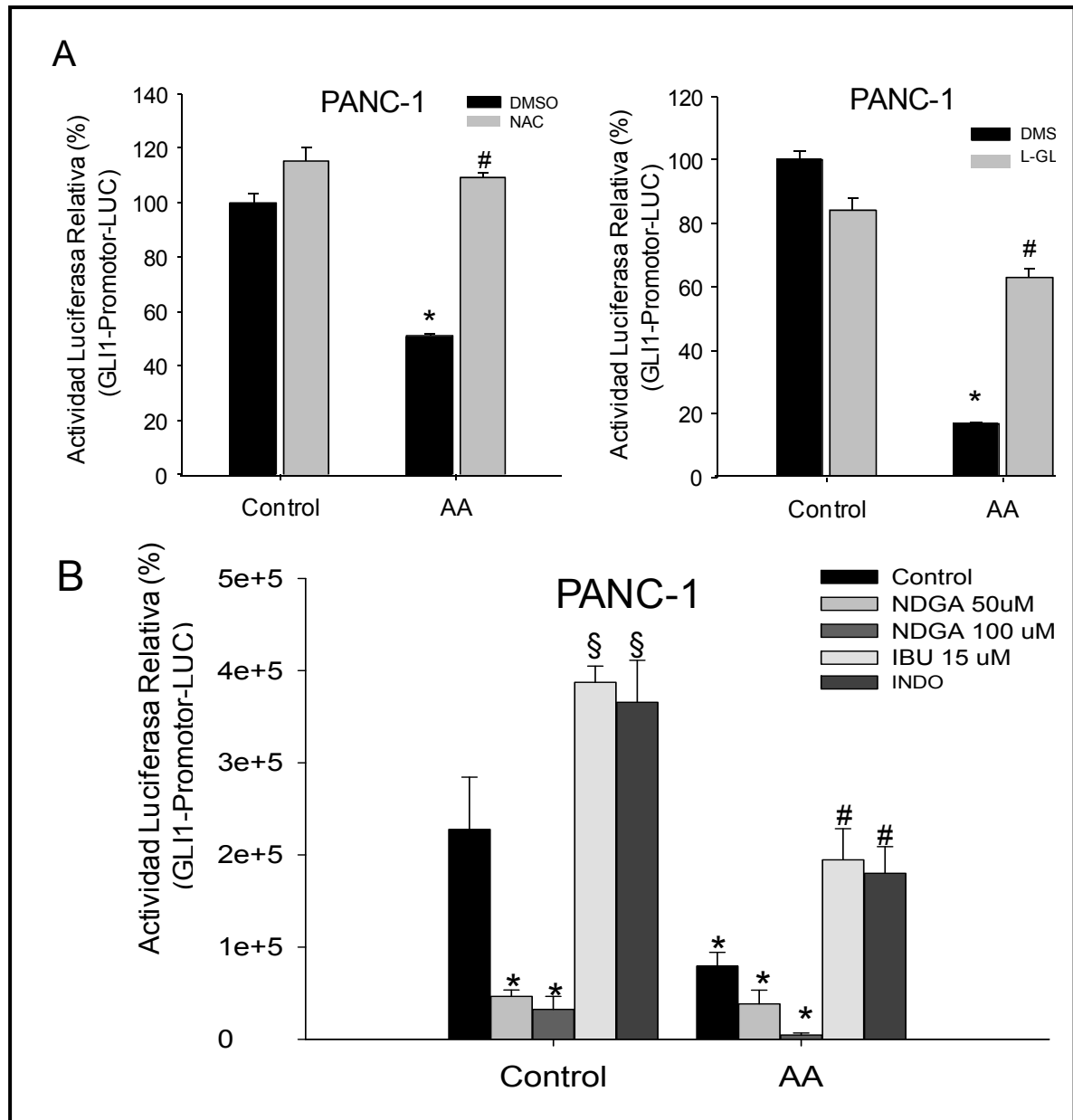


Figura III-11. La inhibición de las vías metabólicas del AA regula la actividad del promotor de GLI1

A) Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC y subsecuentemente tratadas con el antioxidante N-acetil-cisteína (250uM) o L-Glutatión (250 uM) una hora previa al tratamiento con AA y posteriormente co-tratadas con AA (60 µg/ml) o el vehículo control por 6 horas. Media ± SE; n=3. (*) p<0,05 vs grupo control. **B)** Cambios relativos en la actividad luciferasa en células PANC-1 tranfectadas con el vector reportero GLI-Promotor-LUC y subsecuentemente tratadas con los inhibidores de Lipoxigenasas NDGA (50 µM), de Lipoxigenasas y Cicloxigenas conjuntamente NDGA (100 µM) y el inhibidor de Cicloxigenas Ibuprofeno (15 µM) e Indometacina (0,65 µM) una hora previa al tratamiento con AA y posteriormente co-tratadas con AA (60 µg/ml) o el vehículo control por 6 horas. Media ± SE; n=3. (*) p<0,05 vs grupo control. (#) p<0,05 vs AA sin inhibidor. (§) p<0,05 vs grupo control y los otros tratamientos además.

IV- DISCUSIÓN

Ha sido ampliamente descrito que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son capaces de regular el comportamiento celular no solo en poblaciones celulares normales, sino también en diferentes estadios del proceso carcinogénico. Por otra parte, diversos PUFAs pueden actuar como compuestos citotóxicos específicos y desempeñar un rol como moléculas bioactivas implicadas en la red de señalización del cáncer. Algunos estudios, de otros laboratorios y nuestros, sugieren que cambios en el perfil de lípidos de las células o bien perturbaciones en el metabolismo lipídico participan en la modulación del cáncer (24, 29, 84).

A pesar de que el rol biológico de los PUFAs ha sido estudiado extensamente, el mecanismo molecular subyacente de este fenómeno en células cancerígenas todavía no fue caracterizado. En este trabajo, se define un nuevo mecanismo bioquímico de la función inhibidora tumoral del PUFA AA. Nuestros resultados muestran que el AA induce muerte celular *in vivo* e *in vitro*. En este estudio, en el modelo de adenocarcinoma mamario murino utilizado (LM3), se observó que las inyecciones de AA en el lecho tumoral, provocaron una disminución en el crecimiento tumoral e indujeron un aumento en la apoptosis, así como también una disminución en la incidencia de metástasis pulmonares (Figura III-1.A,B) (Tabla III-2 y Figura III-2). Asimismo, el tratamiento *in vitro* de líneas celulares cancerígenas bien tipificadas de mama y páncreas con AA, redujo la viabilidad celular en forma dosis-dependiente e incrementó, al igual que en los experimentos *in vivo*, la muerte celular vía apoptosis. Esta apoptosis inducida fue relacionada con el incremento en la actividad de caspasas 3/7 (Figura III-4.A, B y C).

Nuestros resultados coinciden con estudios experimentales *in vivo* previos, donde se evaluó el efecto citotóxico de los PUFAs. Así se observó, que las inyecciones locales del ácido γ -linoleico (GLA, ω -6), en un modelo de glioma tumoral en ratas, tuvo un efecto anti-proliferativo específico provocando la regresión del tumor (133, 134). A su vez, estudios pre-clínicos en los cuales se administró GLA mediante inyecciones intracerebrales en el lecho de resección de gliomas en pacientes en etapas muy avanzadas, mostraron que este PUFA, indujo de la misma forma, una regresión del tamaño tumoral y significativa prolongación de la vida sin efectos adversos (135, 136). Por otra parte, otros trabajos demostraron también que las inyecciones de los ácidos grasos linoleico y

linolénico incrementaron la sobrevida de ratas portadoras de tumores ascíticos (137). Posteriormente, otros estudios mostraron que el tratamiento sistémico con el ácido graso ω -6 LA disminuyó el crecimiento y la incidencia de metástasis en un modelo murino de linfoma EL4 (138). A su vez, el tratamiento combinado con liposomas compuestos por fosfatidil colina y el PUFA DHA, en un modelo *in vivo* empleando células de carcinoma de colon humano en ratones, indicaron una disminución en el crecimiento tumoral y en la incidencia de metástasis en hígado luego de la administración intravenosa de estos lípidos (139).

Sin embargo no hay estudios *in vivo* que demuestren el efecto citotóxico directo del AA, un PUFA de larga cadena y el más relevante en los fosfolípidos de las membranas, en el desarrollo tumoral; si bien, algunos estudios anteriores han observado que las infusiones intravenosas de diferentes PUFAs marcados radiactivamente, como el PA, AA, DHA y GLA son incorporados en las células tumorales e inducen cambios acordes en el perfil lipídico de las membranas de las células tumorales así como también cambios veloces en el estado oxidativo y anti-oxidativo, sugiriendo de este modo a diversos PUFAs con un significativo valor terapéutico coadyuvante para el tratamiento de algunas variedades de cáncer (140,141).

Coincidentemente con nuestros datos, fue observado en líneas celulares humanas de cáncer de colon enriquecidas con AA promueve la muerte celular mediante un aumento de la actividad de caspasas 3 (80, 142). De manera similar, otros estudios señalaron que el AA exógeno añadido, a células de hepatoma, produjo un cambio en la permeabilidad mitocondrial *in situ* con aumento de la liberación de citocromo c seguido de muerte celular (143). Además, el tratamiento con AA o la inducción de la actividad de la enzima PLA₂, que libera AA para su ulterior metabolismo, mostró una activación en la hidrólisis de esfingomielina y una subsecuente inducción de apoptosis en células neoplásicas mediada por ceramida (144).

Sin embargo, otros estudios *in vitro*, demostraron que el AA también tiene un efecto tumorigénico, lo que sugiere un efecto bimodal del AA en ciertas condiciones experimentales. Los efectos pro-tumorigénicos del AA observados fueron principalmente asociados al aumento de la expresión y actividad de las enzimas que metabolizan al AA como las enzimas COX₂, 5-LOX, 12-LOX y sus metabolitos derivados (PGE₂, 5-HETE y 12-HETE, respectivamente); a su vez la inhibición de estas enzimas disminuyó el crecimiento tumoral (71, 145, 146).

Vistos estos resultados, que confirman acciones bimodales del mismo lipido, según las líneas celulares y las condiciones experimentales, se fundamentaron nuestros objetivos de profundizar en estos resultados previos y dilucidar posibles nuevos mecanismos de acción del AA como uno de los lípidos bioactivos citotóxicos contra células cancerígenas. Definimos en nuestra tesis una nueva vía de señalización diana, a través del cual el AA reduce la viabilidad e induce muerte celular. Los resultados encontrados muestran que este efecto se produce mediante la reducción de la expresión de un subconjunto de genes anti-apoptóticos, los genes BCL-2, BFL1/A1 y 41BB (Figura III-5.A). Además en este trabajo se observó que el AA redujo la expresión de estos genes mediante la regulación de su actividad promotora de manera transcripcional (Figura III-5.B). Varios estudios habían demostrado que el AA reduce la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la apoptosis, incluyendo la conocida proteína anti-apoptótica Bcl-2 (80, 147, 148). Sin embargo, hasta donde conocemos, ningún estudio había relacionado al AA, u otro PUFA con los genes anti-apoptóticos BFL-1/A1 y 4-1BB. En este estudio, por lo tanto definimos a estos dos genes anti-apoptóticos como nuevos genes diana del efecto citotóxico del lípido bioactivo, el AA.

Si bien pocos estudios han demostrado el efecto del AA a nivel transcripcional, Monjazez *et al.* comunicaron, a través de una inhibición general de los factores de transcripción que el AA puede regular la apoptosis en forma dependiente de la transcripción (80). Así en correlación con nuestros resultados, el estudio de dichos autores describe varios factores de transcripción cuya expresión es modulada por el AA. Entre los mismos, el factor de transcripción AP-1 es altamente regulado por este ácido graso.

Además, nuestros resultados muestran por primera vez un mecanismo transcripcional que explica los efectos antitumorales citotóxicos de un PUFA, específicamente el AA. Así, hemos identificado un nuevo factor de transcripción diana modulado por el AA exógeno, el factor de transcripción oncogénico GLI1. Nuestro estudio muestra que la represión de la actividad transcripcional de genes anti-apoptóticos por el AA se relacionó con la disminución de la expresión y actividad del factor de transcripción GLI1 (Figura III-6.A, B y C).

En este contexto, ya fue establecido en varios estudios previos que el gen anti-apoptótica Bcl-2 es un gen diana del factor de transcripción GLI1 (112), al cual GLI1 puede unirse “upstream” de su sitio promotor y regular de esta forma su expresión. En nuestro estudio encontramos además que los genes anti-apoptóticos BFL-1 y 41BB serían

nuevos genes diana del factor GLI1 al igual que Bcl-2 y otros genes relacionados con la apoptosis antes descritos. Según nuestros resultados, el factor de transcripción GLI1, actúa como un regulador directo de la expresión de estos genes (Figura III-8.A, B, C y D).

Además, nuestros estudios muestran que el AA regula la disminución de la expresión de GLI1 a través del silenciamiento de su promotor, añadiendo de esta forma más elementos que describen este mecanismo de acción ejercido por el AA (Figura III-9.A, B y C). En este contexto, ha sido descrito que los PUFAs pueden modular la expresión y/o actividad de factores de transcripción de diferentes maneras. Varios estudios muestran que el factor de transcripción PPAR, puede ser modulado directamente por ácidos grasos, mediante la modificación de la unión entre ligando y a la proteína. Además, se ha identificado en estudios posteriores, a otros factores de transcripción, tales como SREB y NFkB, los cuales pueden ser modulados indirectamente por los ácidos grasos mediante la interacción con su vía de regulación (84, 149). Sin embargo en relación al factor de transcripción GLI1 no había sido establecido hasta el momento una regulación mediada por ácidos grasos. Algunos estudios han mostrado una regulación de la vía de señalización HH por una de las enzimas que metaboliza al AA, la 5-LOX y por sus metabolitos derivados, los Leucotrienos, estableciendo la regulación de esta vía independientemente de GLI1 (150).

A través de nuestros resultados proponemos, un nuevo mecanismo de regulación de GLI1 que es independiente de la vía de HH y centramos a GLI1 como un nexo integrador en la vía de señalización modulada por el AA. En este sentido, se sabe que la proteína oncogénica GLI1 puede ser modulada por vías independientes de HH. En el cáncer de páncreas, el oncogén KRAS aumenta fuertemente la actividad transcripcional de GLI1 a través de la cascada de señalización RAS-MEK-ERK y AKT. Además, la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce la expresión de GLI1 y GLI2 “downstream” de SMO de manera dependiente de la proteína SMAD3. Del mismo modo, GLI puede ser modulado por el factor de transcripción nuclear NFkB y por mediadores oncogénicos tales como la β -catenina (119, 151, 152).

Además de las vías conocidas implicadas en la regulación de GLI, en este trabajo identificamos a NFATc1, un factor de transcripción nuclear de células T activadas, como una nueva vía capaz de regular la expresión de GLI1 y el desarrollo de tumores (Figura III). Nuestros datos mostraron que NFATc1 actúa como un represor en la regulación de la actividad del promotor de la proteína oncogénica GLI1 (Figura III-9.D). Además, el AA

incrementa la unión de NFATc1 al gen de GLI1 (Figura III-9.E). NFAT fue descrito por primera vez como regulador de la activación y la diferenciación de los linfocitos T. Posteriormente, fue relacionado con el control de procesos críticos en diferentes sistemas de vertebrados y no solo en el sistema inmune. Se ha descrito la formación de complejos nucleares de NFAT con diferentes factores de transcripción tales como, Stat3, Smad3, NFkB, cMyc y C/EBP, a través de lo cual se induce la transformación celular y la tumorigénesis. Sin embargo, estudios recientes indican que los complejos de NFAT pueden inducir el silenciamiento de genes a través de la cooperación con factores de transcripción represores y/o con miembros de la familia de las histonas desacetilasas (HDAC) (153-155). En este sentido, nuestros resultados apoyan la actividad represora de NFATc1 ya que observamos además que el AA indujo una disminución de la unión al promotor de GLI1 de la H3-K14-Ac (Figura III-9.F). En este contexto ha sido caracterizado que las histonas nucleosómicas son proteínas altamente modificadas post-traducción, particularmente siendo la H3 una de las histonas mayormente modificada dentro de las cinco variedades de histonas conocidas, teniendo un rol crítico en la regulación epigenética. La acetilación de la H3 ocurre en diferentes lisinas de la cola de las histonas; la acetilación de la lisina 14 (K14) ha sido comúnmente asociada con la transcripción activa de genes (12).

Se conoce que las modificaciones en el patrón y número de acetilaciones en las Histonas como en la H3 produce cambios en la compactación de la cromatina y una dinámica nucleosomal que modifica procesos que requieren el acceso al ADN como actividad transcripcional de diferentes genes, la replicación y la reparación del ADN (12, 13, 157). En este contexto, diferentes enzimas que juegan un papel importante en la regulación epigenética de genes utilizan co-sustratos generados por el metabolismo celular, lo que proporciona de esta manera un posible vínculo entre la nutrición, el metabolismo, y la regulación de genes (12). Asimismo, ha sido descrito que los ácidos grasos saturados y los PUFAs modulan directamente la transcripción de genes a través del receptor nuclear PPAR. Este forma un heterodimero con el receptor de ácido retinoico (PPAR/RXR) y se asocia con el complejo multiproteico co-represor con actividad desacetilasa de histonas (HDAC) o el complejo activador con actividad acetilasa de histonas (HAT), induciendo remodelación de la cromatina e inhibiendo y activando respectivamente la transcripción de genes (149).

De esta manera los resultados de otros laboratorios y los presentes señalan un nuevo mecanismo de regulación transcripcional del PUFA AA en cáncer. Nuestros experimentos

muestran que el AA se comporta como un metabolito señal que actúa en la modulación del factor de transcripción GLI1, como mediador central clave de manera independiente de HH y a través de la inducción de la actividad represora de NFATc1 inhibiendo el desarrollo del cáncer.

A partir de estos resultados, se profundizó en el metabolismo del AA, para elucidar cual era la vía metabólica por la cual el AA ejercía su efecto en la modulación del mecanismo encontrado. Así, han sido propuestos diferentes mecanismos de incorporación y procesamiento del ácido graso AA dentro de las células, modificando los niveles celulares. En tratamientos exógenos con AA se observó que éste puede ser acumulado, como ácido graso libre en el citoplasma y ser utilizado además para síntesis de sus metabolitos derivados o para remodelación de fosfolípidos de membrana, manteniendo una dinámica en la célula según la disposición del AG, de la expresión de las enzimas y del tipo celular. (36, 157, 158). Diferentes estudios muestran que modificaciones en el aporte dietario y/o experimental de la composición de ácidos grasos producen cambios en la estructura y función (biofísica) de las membranas celulares, así como también en el subsecuente metabolismo de lípidos, los cuales fueron asociados con mecanismos de inhibición tumoral (25, 77). En este sentido otros investigadores observaron que células MCF10AneoT tumorales presentaron una actividad reducida de las enzimas Δ -6 desaturasa y de EFAs Δ -6 desaturados en relación a sus contrapartes normales (62, 159). En nuestro trabajo, el análisis de la composición de ácidos grasos de membrana mostró que el tratamiento con AA produjo como era de esperar, un incremento en las membranas de este PUFA y además una modificación en el perfil de ácidos grasos totales (Tabla III-3). Esto concuerda con estudios de M. Oraldini *et al*, quienes mostraron que el contenido de AA en células tumorales indiferenciadas Caco 2 fue menor que en células diferenciadas no tumorales y que el enriquecimiento con AA aumenta en la membrana e induce apoptosis a través de la activación de PPAR α como fue descrito anteriormente (142).

Por otra parte observamos también en nuestro trabajo que el tratamiento con AA induce cambios morfológicos con acumulación en forma de gotas de lípidos citoplasmáticas perinucleares (Figura III-3). Estas modificaciones han sido ya descritas en otros trabajos en los cuales se observó que la suplementación celular con diferentes PUFAs produce una acumulación de ácidos grasos libres en el citoplasma como gotas de lípidos, relacionado a muerte celular en células linfoides y de carcinoma gástrico (160, 161). Otros

investigadores mostraron además que la acumulación de gotas de lípido asociados a apoptosis y fragmentación nuclear tienen un alto porcentaje de lípidos insaturados (162).

En nuestro trabajo, las modificaciones inducidas en el porcentaje de ácidos grasos de las membranas, junto a la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas perinucleares luego del tratamiento con AA se relaciona con el aumento en la peroxidación lipídica tanto de manera no enzimática, que generó un aumento de hidroperóxidos totales no específicos, contribuyendo al estrés oxidativo (Figura III-10.A), como con la generación de eicosanoides derivados de las enzimas LOXs y COXs (Figura III-10.B). Estos resultados se correlacionan con datos mostrados en trabajos de otros grupos en los cuales se mostró que diferentes PUFAs como el AA tienen una acción citotóxica específica, disminuyendo la viabilidad celular e induciendo apoptosis en diferentes líneas celulares cancerígenas, entre ellas, células humanas de cáncer de cervix resistentes a drogas quimioterapéuticas, células de hepatoma de rata AS-30D, células HepG2 de hepatocarcinoma humano dependiente de citocromo P450 2E1, líneas celulares de cáncer pancreático MIA PaCa-2, PANC-1 and CFPAC y células de carcinoma gástrico. En estos trabajos la acción citotóxica fue relacionada con un proceso dependiente de estrés oxidativo con aumento en la formación de peróxidos lipídicos, mediante el cual las modificaciones en los niveles de oxidación de los ácidos grasos y de los fosfolípidos estarían afectando fuertemente las vías de señalización de muerte celular programada (163-165).

En este contexto, en el mecanismo que surge de nuestro trabajo, respecto a la inducción de muerte celular mediante la regulación del factor de transcripción GLI1 como nexo central de la vía de señalización, observamos que la inhibición de los hidroperóxidos totales con antioxidantes como el NAC y el L-GLUT (Figura III-11.A), así como también la inhibición de las enzimas COXs (Figura III-11.B), específicamente revierten el efecto del AA en la disminución de la actividad de promotor de GLI1. Sin embargo, la inhibición de las vías de las LOXs no modificó este efecto de inhibición del promotor de GLI1, sino que por el contrario aumentó aún más su inhibición, siendo mayor cuando se inhibió las LOXs y COXs conjuntamente (Figura III-11.B). En este sentido se conoce que, el aumento en el estrés oxidativo modula directa o indirectamente diferentes vías de señalización, entre ellas la vía de las PLC γ , PKC, ERK, JNK, p38, PI3K/AKT que llevan consecuentemente a la regulación de la actividad de factores de transcripción tales como HSF1, p53, STAT, c-JUN, NF κ B, los cuales modifican finalmente la expresión de genes involucrados en supervivencia y muerte celular (166, 167). Asimismo en otros trabajos se observó un aumento

en la generación de eicosanoides derivados de las enzimas LOXs como la lipoxina A4 (LXA4), que no se correlacionó con la habilidad de producir apoptosis (160). Por otra parte, nuestros resultados se relacionan con estudios previos de nuestro laboratorio en los que se observó que los derivados de las enzimas 5- y 12-lipoxigenasas, como el 5-HETE o 12-HETE respectivamente no estarían actuando como compuestos anti-tumorales sino que aumentan la proliferación celular e inhiben la apoptosis, señalando nuevamente el efecto bimodal de los PUFAs y sus metabolitos (69). Los metabolitos de la 5-LOX, tales como el 5-HETE y el LTB₄, favorecen significativamente la fosforilación de las proteínas MEK/ERK y PI3K/Akt, promoviendo así la proliferación celular (134, 168). Así, se demostró que la 5-LOX es responsable de un efecto mitogénico en células PC3 de cáncer de próstata, a través de la señalización de EGFR (83). Otros investigadores han propuesto una acción proliferativa a través de la inducción de la enzima 5-LOX, por un mecanismo que controla la integridad mitocondrial a través de la transcripción del gen TGF- α de manera autocrina en la célula (82). Además, el producto más abundante de la 12-lipoxigenasa, el 12-HETE estimula marcadamente la proliferación de células tumorales, la cual depende del tiempo y la concentración, a través de la activación de las quinasas de tirosina (81). Por otro lado, investigaciones de otros autores demostraron que la inhibición selectiva de la enzima 12-LOX, inhibe la proliferación de células cancerígenas de pulmón H460, a través de la detención de la fase S y la inducción de apoptosis, al disminuir los niveles de Bcl-2 y la Proforma de la caspasa-3, al mismo tiempo que aumentó los niveles de p53 y de la proteína Bax (169). No obstante, otros autores observaron, en las células de cáncer de próstata, resultados contradictorios en relación a las enzimas 15-LOXs, donde la 15-LOX-1 y 15-LOX-2 tuvieron un efecto pro-tumorigénico y anti-tumorigénico, disminuyendo y aumentando respectivamente, la actividad de PPAR- δ a través de la activación de la vía MAPK y AKT (170).

Por otra parte, en relación a las enzimas cicloxigenasas, ha sido observado en otros trabajos, que derivados de la COX₂ como la PGE₂ indujeron proliferación celular por activación de la vía Ras-Erk y de la glicogeno sintetasa kinasa-3 β (GSK3 β)- β -catenina, promoviendo la supervivencia de células tumorales por activación de la cascada PI3K-Akt-PPAR δ e inhibiendo la apoptosis por disminución de BCL-2 y activación de NFK β . Sin embargo, otros derivados de las enzimas COX₂ como la PGD₂ y su producto derivado como el 15dPGJ₂, inhibieron el desarrollo tumoral a través de la unión al PPAR γ . Además, el 15-PGDH altamente expresado en tejidos normales se pierde en tejidos tumorales (72).

A su vez se ha observado que, derivados de las enzimas COXs como el 12-HHT, marcador de oxidación lipídica, muestra efectos antitumorales y anti inflamatorios (69).

Otros estudios han demostrado que la inhibición conjunta de las enzimas COX₂ y 5-LOX actúan como inhibidores y tienen un efecto aditivo disminuyendo el desarrollo tumoral en un modelo de ratón xenografts de cáncer humano de colon, mama y esófago y reduciendo la incidencia de metástasis en un modelo en hámster de adenocarcinoma pancreático inducido (171, 172)

De esta manera, podemos decir que en nuestro modelo experimental estudiado, que el tratamiento con AA induce cambios en los niveles celulares de ácidos grasos, con acumulación de AA, el cual es sustrato de oxidación lipídica, la cual mediante la generación de hydroperoxidos totales (estrés oxidativo) y metabolitos derivados de las enzimas COXs como el 12-HHT entre otros, estarían induciendo, como fue antes descrito en detalle, la activación del mecanismo de muerte celular, con disminución del factor de transcripción oncogénico GLI1 (Figura III-10 y III-11). En relación al metabolismo lipídico y en particular del AA, los efectos observados en relación al efecto citotóxico de PUFAs son el balance de una compleja interacción de estas vías metabólicas. Por otra parte la inhibición de una de las vías metabólicas conduce a un aumento en la actividad de otras vías, ya que funcionan conjuntamente dentro de la célula compitiendo por el mismo sustrato y actuando con un efecto bimodal (homeostasis) según los productos formados. El conocimiento de las bases moleculares en la carcinogénesis y la caracterización individual de cada caso, así como el conocimiento en la acción de los derivados lipídicos y el perfil de estos compuestos biológicos activos, con un enfoque que contemple que los PUFAs tienen actividad tipo balancín, pueden ser usados como biomarcadores para la prevención o tratamiento del cáncer.

En conjunto, los resultados de este trabajo muestran que los macronutrientes tales como PUFAs controlan la expresión de genes diana implicados en el proceso carcinogénico. Así, estos resultados permiten ampliar nuestra comprensión de la compleja red de señalización implicada en la regulación de la función de GLI1 en las células cancerosas. El conocimiento de los mecanismos por los cuales estos ácidos grasos esenciales controlan la expresión de genes específicos puede proporcionar información para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas co-adyuvantes y de fármacos para la prevención y tratamiento en ciertas variedades de cáncer.

V- CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo, sugieren un mecanismo regulatorio de la sobrevida en células derivadas de cáncer de mama y páncreas, que unen al metabolismo de los lípidos, específicamente el ácido graso poliinsaturado 20:4, ω -6, el AA con el factor de transcripción oncogénico GLI1 (FIGURA V-1).

Nuestros datos muestran que:

- El PUFA ω -6 AA induce muerte en células cancerosas *in vivo* e *in vitro*. La inducción de apoptosis fue atribuida al incremento en la actividad de caspasas 3/7.
- El mecanismo molecular de acción analizado indica que el AA reduce la expresión de los genes anti apoptóticos BCL-2, BFL1/A1 y 41BB a través de la regulación de su transcripción.
- La disminución de la actividad transcripcional en estos genes anti-apoptóticos está asociada al silenciamiento del factor de transcripción GLI1. Se definen además que los genes BFL-1/A1 y 41BB son nuevos genes diana de GLI1, el cual actúa directamente como regulador de la expresión de estos genes.
- Estos resultados señalan además que el AA disminuye la expresión de GLI1 a través de la represión de su promotor en forma independiente de la vía HH, una de las principales vías de señalización que regula la expresión y la actividad de GLI1.
- Relacionado a esto, el análisis del mecanismo ejercido por el AA en el promotor de GLI1 muestra que el AA promueve la unión del factor de transcripción NFATc1, el cual actúa como represor de GLI1. Esto se correlaciona con la disminución de las H3 acetiladas.
- Por último se observa que el AA aumenta la síntesis de hidroperóxidos lipídicos a través de la vía enzimática y no enzimática, siendo esta última, y la vía de las COXs una de las posibles responsables de los efectos de muerte celular inducida por el AA a través de la regulación de GLI1.

Todos estos datos en conjunto, sugieren al AA con funciones anti-carcinogénicas a través de la regulación de la actividad y expresión del factor oncogénico GLI1. Todos estos resultados obtenidos proveen datos originales y una interpretación alternativa dentro de las complejas vías de señalización de los PUFAs involucradas en la carcinogénesis, macronutrientes que deben estar presentes en la dieta saludable de los seres humanos.

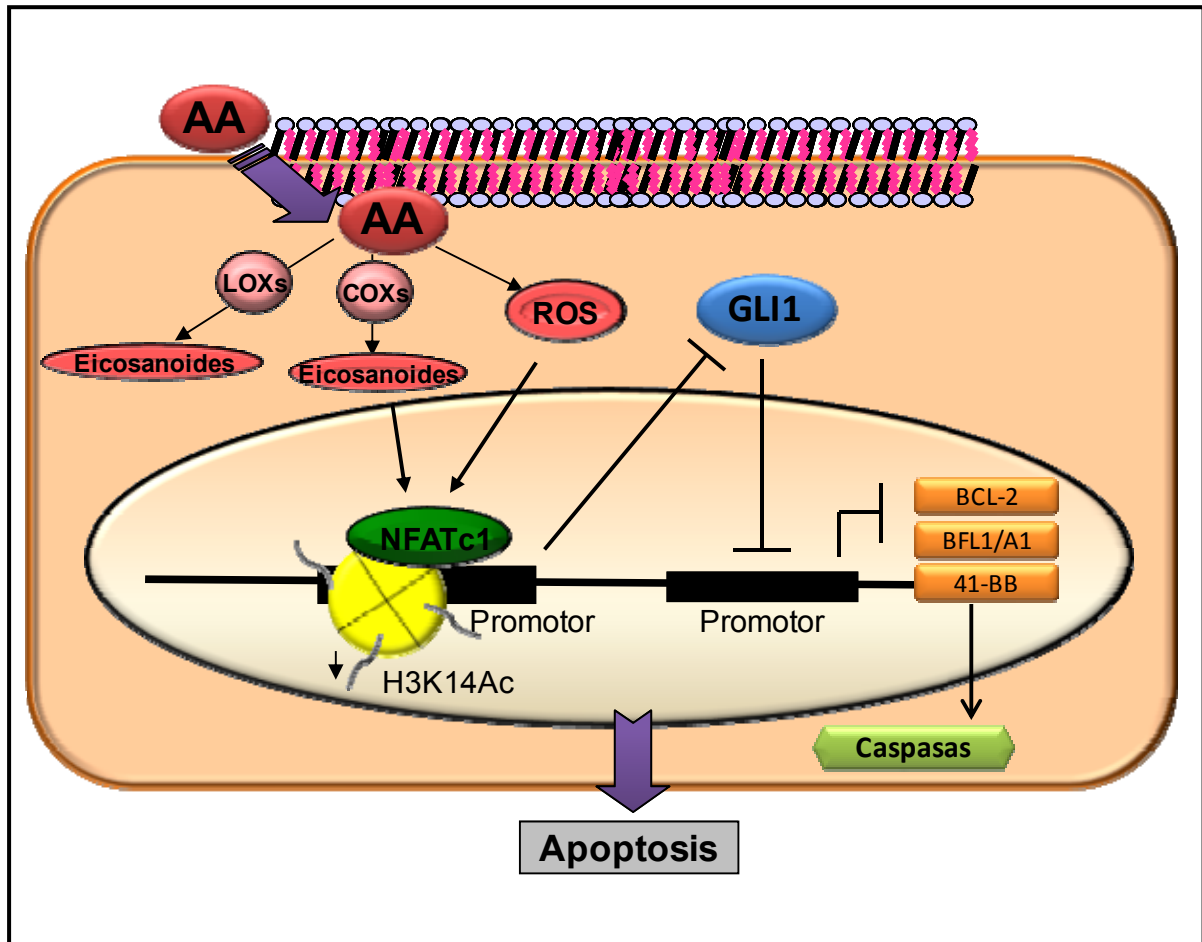


Figura V-I. Representación esquemática del mecanismo de acción antitumoral ejercido por el AA.

El AA induce mediante sus metabolitos derivados, tanto de la vía no enzimática como de la vía enzimática de las COXs, la activación del represor NFATc1 y la disminución de las H3K14Ac. Esto provoca la disminución de la expresión y la actividad del factor de transcripción GLI1, el cual actúa directamente como regulador de los genes anti-apoptóticos Bcl-2, Bfl1/A1 y 41-BB disminuyendo su expresión; esto induce el aumento de la apoptosis a través de la activación de Caspasas 3/7 en células cancerígenas.

VI- BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart, B.W., Kleihues P. (2003) World Cancer Report. IARC non serial publications. WHO International Agency for Cancer Research. IARC Press, Lyon, France. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/2350813/world-cancer-report-2003-stuart-e-kleihues-WHO-e-IARC>.
2. Organización Panamericana de la Salud, Plan de Acción de la OPS de Prevención y Control del Cáncer. Washington, DC, 2008.
3. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012) Cancer statistics 2012. *CA Cancer J.Clin.* **62**, 10–29.
4. World Cancer Research Fund (WCRF), American Institute for Cancer Research (AICR). (2007) Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. p 517. Washington DC, AICR.
5. Bosetti, C., Malvezzi, M., Chatenoud, L., Negri, E., Levi, F., La Vecchia, C. (2005) Trends in cancer mortality in the Americas, 1970–2000. *Annals of Oncology* **16**, 489–511.
6. Diaz, M.P., Osella, A.R., Aballay, L.R., Munoz, S.E., Lantieri M.J., Butinof, M., Meyer Paz, R., Pou, S., Eynard, A.R., La Vecchia, C. (2009) Cancer incidence pattern in Cordoba. *European Journal of Cancer Prevention*, **18**, 259–266.
7. Diaz, M.P., Corrente, J.E., Osella A.R., Muñoz, S.E., Aballay, L.R. (2010) Modeling Spatial Distribution of Cancer Incidence in Cordoba, Argentina. *Applied Cancer Research* **30**, 245-252.
8. Alberts B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, A.P. (2007) *Molecular Biology of the Cell, Cancer* pp. 1205-1268. Fifth Edition. Garland Science Taylor & Francis Group. New York, USA.
9. Harada, K., Hiraoka, S., Kato, J., Horii, J., Fujita, H., Sakaguchi, K., Shiratori, Y. (2007) Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. *Br J Cancer* **97**, 1425-31.
10. Hanahan D. and Weinberg R.A. (2011) Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674.

11. Weinberg R.A. (2007) *The Biology of Cancer*. Garland Science Taylor & Francis Group. New York, USA.
12. Kaelin W.G. Jr., McKnight S.L. (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* **153**, 56-69.
13. Zentner G.E., Henikoff S. (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 259-266.
14. Mc Cleary-Wheeler A.L., Lomberk G.A., Weiss F.U., Schneider G., Fabbri M., Poshusta T.L., Dusetti N.J., Baumgart S., Iovanna J.L., Ellenrieder V., Urrutia R., Fernandez-Zapico M.E. (2013) Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett.* **328**, 212-221.
15. Iovanna J.L., Marks D.L., Fernandez-Zapico M.E., Urrutia R. (2013) Mechanistic insights into self-reinforcing processes driving abnormal histogenesis during the development of pancreatic cancer. *Am J Pathol.* **182**, 1078-1086.
16. Mathers, J.C., Strathdee, G., Relton, C.L. Induction of Epigenetic Alterations by Dietary and Other Environmental Factors. *Advances in Genetics* **71**, 3-39.
17. Ames, B.N. (2001) ADN damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* **475**, 7-20
18. Navarro A., Osella A., Muñoz S.E., Lantieri M.J., Fabro E.A., A.R. Eynard. (1998) Fatty acids, fibres and colorectal cancer risk in Córdoba, Argentina". *J. Epidemiol. Biostat.* **3**, 415-422.
19. Navarro A., Eynard A.R. (2013) Crosstalk among dietary polyunsaturated fatty acids, urolithiasis, chronic inflammation, and urinary tract tumor risk. *Nutrition* **29**, 930-938.
20. Pou, S.A., Diaz, M.P., Osella, A.R. (2011) Applying multilevel model to the relationship of dietary patterns and colorectal cancer: an ongoing case-control study in Córdoba, Argentina. *European Journal of Nutrition* **51**, 755-764.
21. Fenech, M., El-Sohemy, A., Cahill, L., Ferguson, L.R., Tapaeru-Ariki, C., Shyong F.E., Milner T.J., Lin Xie, W.P.K., Zucker, M., Buckley, M., Cosgrove, L., Lockett, T., Fung, K.J.C., Head, R. (2011) Nutrigenetics and Nutrigenomics: Viewpoints on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* **4**, 69-89.
22. Yuan Y., Ferguson, L.R. (2011) Nutrigenetics and Prostate Cancer: 2011 and Beyond. *Journal of Nutrigenetic and Nutrigenomics* **4**, 121-136.

23. Tapiero, H., Ba, G.N., Couvreur, P., Tew, K.D. (200) Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacoter* **56**, 215-222.
24. Pasqualini, M.E., Berra, M.A., Yurawecz, M.P., Repossi, G., Eynard, A.R. (2008) Dietary manipulation of precursor PUFAs modulates eicosanoid and endocannabinoid synthesis: a potential tool to control tumor development. *Current Nutrition and Food Science* **3**, 1-15.
25. Calderón, R.O., Eynard, A.R. (2000). Fatty acids specifically related to the anisotropic properties of plasma membrane from rat urothelium. *Biochimica et Biophysica Acta* **1483**, 174–184.
26. Abumrad, N., Coburn, C., Ibrahim, A. (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica et Biophysica Acta* **1441**, 4–13.
27. Ehehalt, R., Sparla, R., Hasan Kulaksiz, H., Herrmann, T., Füllekrug, J., Stremmel, W. (2008). Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). *BMC Cell Biology* **9**, 45-56
28. Calder, P.C., Budge, G.C. (2004) Fatty acids. In A. Nicolaou & G. Kokotos (Eds.), *Bioactive lipids*. pp. 1–36. The Oil Press. England.
29. Das, U.N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal*, **4**, 420–439.
30. Eynard A.R (1996) Role of dietary polyunsaturated fatty acid (PUFA) on tumorigenesis. *The Cancer Journal* **9**, 142-144.
31. Qiu, X. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6–4): two distinct pathways. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* **68**, 181–186.
32. Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J. R., et al. (2010). Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16840–16845.
33. Gutteridge JM. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* **41**, 1819-1828.
34. Bochkov, V.N., Oskolkova, O.V., Birukov, K.G., Levonen, A.L., Binder, C.J., Stockl, J. (2010) Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxidants & Redox Signaling* **12**, 1009-1060.

-
35. Eynard, A.R., Pasqualini, M.E. (1987) Platelet eicosanoids and hypercholesterolemia. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 45, 6-8. Review.
36. Brash, A.R. (2001). Arachidonic acid as bioactive molecule. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 1339–1345.
37. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–1875.
38. Nebert, D.W., Russell, D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. **360**, 1155–1162.
39. Wang, D., Du Bois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**, 181–193.
40. Murakami, M. (2011). Mediators in life sciences. *Experimental Animals* **60**, 7–20
41. Lands, W. E. (2000). Stories about acyl chains. *Biochimica et Biophysica Acta* **1483**, 1–14.
42. Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E. R., & Huang, S. (2010). Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Reviews* **29**, 723–735.
43. Das, U. N. (2010). Essential fatty acids: biochemistry and physiology. In U. N. DAs (Ed.), *Metabolic syndrome pathophysiology: the role of essential fatty acids*. pp. 181–200). California: Wiley-Blackwell.
44. Calder, P.C. (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **75**, 197–202.
45. Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* **8**, 349–361.
46. Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S., Arita, M. (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **73**, 155–172.
47. O'Donnell, V.B., Maskrey, B., Taylor, G.W. (2009) Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **462**, 5–23.
48. Schneider, C., Brash, A.R. (2002) Lipoxygenase-catalyzed formation of R-configuration hydroperoxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 291–301.
-

49. Kim, C., Kim, J.Y., Kim, J.H. (2008) Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep.* **41**, 555–559.
50. Brock, T.G., Peters-Golden, M. (2007) Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *Scientific World Journal* **7**, 1273–1284.
51. Dain, A., Repossì, G., Das, U.N., Eynard, A.R. (2010) Role of PUFAs, the precursors of endocannabinoids, in human obesity and type 2 diabetes. *Front Biosc.* **2**, 1432-47. Review.
52. Brash, A.R., & Ingram, C.D. (1986). Lipoxygenase metabolism of endogenous arachidonate in leukocytes: GC-MS analyses of incubations in H2180 Buffers. prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine **23**, 149–154.
53. Eynard, A.R., Galli, G., Tremoli, E., Maderna, P., Magni, F., & Paoletti, R. (1986). Aspirin inhibits platelet 12-hydroxyeicosatetraenoic acid formation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **107**, 73–78.
54. Hwang, D. H. (1982). Characteristics of the formation of the platelet lipoxygenase product from endogenous arachidonic acid. *Lipids* **17**, 845–847.
55. Lundbæk, J.A., Collingwood, S.A., Ingolfsson, H.I., Kapoor, R., & Andersen, O.S. (2010). Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *Journal of the Royal Society Interface* **7**, 373–395.
56. Grasso, E.J., Bongiovanni, G.A., Pérez,R.D., Calderón, R.O. (2011) Pre-cancerous changes in urothelial endocytic vesicle leakage, fatty acid composition, and As and associated element concentrations after arsenic exposure. *Toxicology* **284**, 26-33.
57. Grasso, E.J., Scalambro, M.B., Calderón, R.O. (2011) Differential response of the urothelial V-ATPase activity to the lipid environment. *Cell Biochem Biophys.* **61**, 157-68.
58. Murphy, M. G. (1990). Dietary fatty acids and membrane protein function. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **1**, 68–79.
59. Calder, P. C., & Yaqoob, P. (2007). Lipid rafts composition, characterization and controversies. *Journal of Nutrition* **137**, 545–547.
60. Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research* **44**, 655–667.
61. Flavin, R., Zadra, G., & Loda, M. (2011). Metabolic alterations and target therapies in prostate cancer. *The Journal of Pathology* **223**, 283–294.

62. Grammatikos, S., Harvey, M., Subbaiah, P. V., Victor, T., & Miller, W. (1995). Loss of fatty acid Δ -6 desaturating ability in human mammary epithelial cells that express an activated c-Ha-ras oncogene. *International Journal of Oncology* **6**, 1039–1046.
63. Brenner RR, Peluffo RO. (1966) Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. *J Biol Chem.* 241, 5213-9.
64. Das, U.N. (2008). Can essential fatty acids reduce the burden of disease(s)?. *Lipids in Health and Disease* **7**, 19-23.
65. Fuehrer, T., Hoeflmaier, D., Jaeger-Lansky, A., Rasin-Streden, D., et al. (2011). Sphingosine kinase 1 is a relevant molecular target in gastric cancer. *Anticancer Drugs* **22**, 245–252.
66. Hilvo, M., Denkert, C., Lehtinen, L., Muller, B., et al. (2011). Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Research* **71**, 3236–3245.
67. Duplus, E., Glorian, M., Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 30749–30752.
68. Huang, Z. H., Gu, D., Mazzone, T. (2004). Oleic acid modulates the post-translational glycosylation of macrophage ApoE to increase its secretion. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 29195–29201.
69. Comba, A., Maestri, D.M., Berra, M.A., Garcia, C.P., Das, U.N., Eynard, A.R., Pasqualini, M.E. Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis.* **9**, 112, 2010.
70. Pidgeon, G.P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J.V., O’Byrne, K., Nie, D., Honn, K.V. (2007) Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 503–524.
71. Comba, A., Pasqualini, M.E. (2009) Primers on Molecular Pathways-Lipoxygenases: Their Role as an oncogenic Pathway in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* **9**, 724-728.
72. Wang, D. and DuBois, R.N. (2010) Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 181–193.
73. Lu, X., Yu, H., Ma, Q., Shen, S., & Das, U. N. (2010). Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids in Health and Disease* **9**, 106–117.

74. Notarnicola, M., Messa, C., Refolo, M. G., Tutito, V., et al. (2011). Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line. *Lipids in Health and Disease* **10**, 10.
75. Jiang, W.G., Bryce, R.P., Mansel, R.E. (1997). Gamma linoleic acid regulates gap junction communication in endothelial cells and their interaction with tumor cells. *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Acids* **56**, 307–316.
76. Eynard, A.R., Jiang, W.G., Mansel, R.E. (1998). Eicosatrienoic acid (20:3 n-9) inhibits the expression of Ecadherin and desmoglein in human squamous cell carcinoma in vitro. *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Acids* **59**, 371–377.
77. Pasqualini, M.E., Heyd, V.L., Manzo, P., Eynard, A.R. (2003). Association between E-cadherin expression by human colon, bladder and breast cancer cells and the 13-HODE: 15-HETE ratio. A possible role of their metastatic potential. *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Acids* **68**, 9–16.
78. Scheim, D.E. (2009). Cytotoxicity of unsaturated fatty acids in fresh human tumor explants: concentration thresholds and implications for clinical efficacy. *Lipids in Health and Disease* **8**, 54–65.
79. Das, U.N. (2007). γ -linoleic acid therapy of human glioma- a review of in vitro, in vivo and clinical studies. *Medical Science Monitor* **13**, 119–131.
80. Monjazebe, A.M., High, K.P., Conroy, A., Hart, L.S., Koumenis, C., Chilton, F.H. (2006). Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 1950–1960.
81. Smith, W.L., Murphy, R.C. (2002). The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In D. E. Vance & J. E. Vance (Eds.), *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (pp. 341–372). Elsevier, Smith and Murphy. New York.
82. Terano, T., Salmon, J.A., Moncada, S. (1984). Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₅. *Prostaglandins* **27**, 217–232.
83. Arnold, C., Markovic, M., Blossey, K., Wallukat, G., et al. (2010). Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of (omega)-3 fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 32720–32733.

84. Comba, A., Lin, Y.H., Eynard, A.R., Valentich, M.A., Fernandez-Zapico, M.E., Pasqualini, M.E. (2011) Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 325-42.
85. Roeder, R.G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett.* **579**, 909-15. Review.
86. Kadonaga, J.T. (2004) Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell.* **116**, 247-57. Review.
87. Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., Gustafsson, J.A. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4653–4657.
88. Kliewer, S.A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., et al. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4318–4323.
89. Zoete, V., Grosdidier, A., Michielin, O. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta* **1771**, 915–925.
90. Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R.M. (2001). PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature Medicine* **7**, 48–52.
91. Yin, Y., Russell, R.G., Dettin, L.E., Bai, R., Wei, Z.L., Kozikowski, A.P. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Research* **65**, 3950–3957.
92. Zhai, J.J., Liu, Z. L., Li, J. M., Chen, J. P., Jiang, L., Wang, D. M., et al. (2010). Different mechanisms of cis-9, trans-11- and trans-10, cis-12- conjugated linoleic acid affecting lipid metabolism in 3T3-L1 cells. *The Journal of Nutrition Biochemistry* **21**, 1099–1105.
93. Narala, V.R., Adapala, R.K., Suresh, M.V., Brock, T.G., Peters-Golden, M., Reddy, R.C. (2010). Leukotriene B4 is physiologically relevant endogenous peroxisome

- proliferators activated receptor- α agonist. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 22067–22074.
94. Eynard, A.R., Tremoli, E., Caruso, D., Magni, F., Sirtori, C.R., Galli, G. (1986). Platelet formation of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and thromboxane B2 is increased in type IIA hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* **60**, 61–66.
95. Fields, A.P., & Murray, N.R. (2008). Protein kinase C isozymes as therapeutic targets for treatment of human cancers. *Advance in Enzyme Regulation* **48**, 166–178.
96. Zhao, Y., Joshi-Barve, S., Barve, S., Chen, L.H. (2004). Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF- α expression by preventing NF- κ B activation. *Journal of the American College of Nutrition* **23**, 71–78.
97. Rozengurt, E. (2011). Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology* **26**, 23–33.
98. Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., Hwang, D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16683–16689.
99. Lee, J.Y., Plakidas, A., Lee, W.H., Heikkinen, A., Chanmugam, P., Bray, G., et al. (2003). Differential modulation of toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, **44**, 479–486.
100. Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., et al. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12027–12032.
101. Matsuda, M., Korn, B. S., Hammer, R. E., Moon, Y. A., Komuro, R., Horton, J. D., et al. (2001). SREBP cleavage activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes & Development* **15**, 1206–1216.
102. Michelle K. Mater, Annette P. Thelen, David A. Pan, and Donald B. Jump. (1999) Sterol Response Element-binding Protein 1c (SREBP1c) Is Involved in the Polyunsaturated Fatty Acid Suppression of Hepatic S14 *Gene Transcription*. *J. Biological Chemistry* **274**, 32725–32732.
103. Moreno, J.J. (2009). New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. *Biochemical Pharmacological* **77**, 1–10.

-
104. Tang, D.G., La, E., Kern, J., Kehrer, J.P. (2002). Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biological Chemistry* **383**, 425–442.
 105. Liu, J.F., Fong, Y.C., Chang, C.S., Huang, C.Y., Chen, H.T., Yang, W.H., et al. (2010). Cyclooxygenase-2 enhances alpha2beta1 integrin expression and cell migration via EP1 dependent signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Molecular Cancer* **9**, 43–57.
 106. Kravchenko, I.V., Furalyov, V.A., Lisitsina, E.S., Popov, V.O. (2011). Stimulation of mechano-growth factor expression by second messengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **507**, 323–331.
 107. Ruiz, I.A, Mas, C, Stecca, B. (2007) The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* **17**, 438–447.
 108. Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A.M., Aberger, F. (2006) GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*; **42**, 437–445.
 109. Pasca di Magliano, M., Hebrok, M. (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*; **3**, 903–911.
 110. Pasca di Magliano, M., Sekine, S., Ermilov, A., Ferris, J., Dlugosz, A.A., Hebrok, M. (2006) Hedgehog/ Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev.* **20**, 3161–3173.
 111. Fernandez-Zapico, M.E. (2006) A defined survival pathway underlies the critical effects of Hedgehog on pancreatic carcinogenesis. *Pancreas* **33**, 460.
 112. Bigelow, R.L., Chari, N.S., Unden, A.B., Spurgers, K.B., Lee, S., Roop, D.R., Toftgard, R., McDonnell, T.J. (2007) Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem.* **279**, 1197–1205.
 113. Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E., Taipale, J. (2006) Genome- wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription factor- binding affinity. *Cell* **124**: 47–59.
 114. Fernández-Zapico, M.E. (2008) Primers on Molecular Pathways. GLI: More than Just Hedgehog? *Pancreatology* **8**, 227–229.
 115. Huntzicker, E.G., Estay, I.S., Zhen, H.H., Lokteva, L.A., Jackson, P.K. and Oro, A.E. (2006) Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes Dev.* **20**, 276–281
 116. Riobo, N.A. and Manning, D.R. (2007) Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem. J.* **403**, 369–379. Review.

-
117. Jacob, J., Briscoe, J. (2003) Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* **4**, 761-765.
118. Beachy, P.A., Karhadkar, S.S., Berman, D.M. (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**, 324-331.
119. Fernandez-Zapico, M.E. (2007) Non-Canonical Activation of GLI Transcription Factors Implications for Targeted Anti-Cancer Therapy. *Cell Cycle* **6**, 2458-2463.
120. Mazumdar, T., DeVecchio, J., Agyeman, A., Shi, T., Houghton, J.A. (2011) The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget* **2**, 638-645.
121. Urtreger, A.J., Ladeda, V.E., Puricelly, L.I., Rivelli, A., Vidal, M.D.C., Sacerdote De Lustig, E. And Bal De Kier Joffe', E. (1997). Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int. J. Oncol.* **11**, 489-496.
122. Foy, K.C., Miller, M.J., Moldovan, N., Bozanovic, T., Carson Iii, W.E., Kaumaya, P.T. (2012) Immunotherapy with HER-2 and VEGF peptide mimics plus metronomic paclitaxel causes superior antineoplastic effects in transplantable and transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncoimmunology* **1**, 1004-1016.
123. Fernandez-Zapico, M.E., Mladek, A., Ellenrieder, V., Folch-Puy, E., Miller, L., Urrutia, R. (2003) An mSin3A interaction domain links the transcriptional activity of KLF11 with its role in growth regulation. *The EMBO Journal* **22**, 4748-4758
124. Nolan-Stevaux, O., Lau, J., Truitt, M.L., Chu, G.C., Hebrok, M., Fernández-Zapico, M.E., Hanahan, D. (2009) GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* **23**, 24-36.
125. Soria, E.A., Eynard, A.R., Quiroga, P.L., Bongiovanni, G.A. (2007) Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sciences* **81**, 1397-1402.
126. ElSawa, S.F., Almada, L.L., Ziesmer, S.C., Novak, A.J., Witzig, T.E., Ansell, S.M., Fernandez-Zapico, M.E. (2011) GLI2 transcription factor mediates cytokine cross-talk in the tumor microenvironment. *J. Biol. Chem.* **286**, 21524-21534.
127. Köenig, A., Linhart, T., Schlegemann, K., Reutlinger, K., Wegele, J., Adler, G., Singh, G., Hofmann, L., Kunsch, S., Büch, T., Schäfer, E., Gress, T.M., Fernandez-Zapico, M.E., Ellenrieder, V. (2010) NFAT-induced histone acetylation relay switch
-

- promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* **138**, 1189-1199.
128. Hamalainen-Laanaya, H.K., Orloff, M.S. (2012) Analysis of cell viability using time-dependent increase in fluorescence intensity. *Anal. Biochem.* **429**, 32-38.
129. Lo Ré, A.E., Fernández-Barrena, M.G., Almada, L.L., Mills, L.D., Elswa, S.F., Lund, G., Ropolo, A., Molejon, M.I., Vaccaro, M.I., Fernandez-Zapico, M.E. (2012) Novel AKT1-GLI3-VMP1 pathway mediates KRAS oncogene-induced autophagy in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 25325-25334.
130. Soria, E.A., Eynard, A.R., Quiroga, P.L., Bongiovanni, G.A. (2007) Differential effects of quercetin and silymarin on arsenite-induced cytotoxicity in two human breast adenocarcinoma cell lines. *Life Sci.* **81**, 1397-402.
131. Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola. (2008) Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal Biochem.* **377**, 1-15.
132. Quiroga, A., Quiroga, P.L., Martínez, E., Soria, E.A., Valentich, M.A. (2010) Anti-breast cancer activity of curcumin on the human oxidation-resistant cells ZR-75-1 with gamma-glutamyltranspeptidase inhibition. *J Exp Ther Oncol.* **8**, 261-6.
133. Leaver, H. A., Wharton, S. B., Bell, H. S., Leaver-Yap, I. M., Whittle, I. R. (2002). Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* **67**, 283–292.
134. Miyake, J.A., Benadiba, M., Colquhoun, A. (2009). Gammalinolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression. *Lipids in Health and Disease* **17**, 8-17.
135. Bakshi, A., Mukherjee, D., Bakshi, A., Banerji, A.K., Das, U.N. (2003) Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Nutrition* **19**, 305-309.
136. Das, U.N., Prasad, V.V., Reddy, D. R. (1995) Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. *Cancer Letters* **94**, 147–155.
137. Siegel, I., Liu, T.L., Yaghoubzadeh, E., Keskey, T.S., Gleicher, N. (1987) Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **78**, 271-277.

138. Salem, M.L. (2005) Systemic treatment with n-6 polyunsaturated fatty acids attenuates EL4 thymoma growth and metastasis through enhancing specific and non-specific anti-tumor cytolytic activities and production of TH1 cytokines. *Int Immunopharmacol.* **5**, 947-60.
139. Ichihara H, Zako K, Komizu Y, Goto K, Ueoka R. (2011) Therapeutic effects of hybrid liposomes composed of phosphatidylcholine and docosahexaenoic acid on the hepatic metastasis of colon carcinoma along with apoptosis in vivo. *Biol Pharm Bull.* **34**, 901-905.
140. Giamarellos-Bourboulis, E.J., Skiathitis, S., Dionyssiou-Asteriou, A., Donta, I., Hatziantoniou, S., Demetzos, K., Papaioannou, G.T., Karatzas, G., Giamarellou, H. (2002) Rapid alterations of serum oxidant and antioxidant status with the intravenous administration of n-6 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **67**, 57-62.
141. Nariai, T., Greig, N.H., DeGeorge, J.J., Genka, S., Rapoport, S.I. (1993) Intravenously injected radiolabelled fatty acids image brain tumour phospholipids in vivo: differential uptakes of palmitate, arachidonate and docosahexaenoate. *Clin Exp Metastasis* **11**, 141-149.
142. Oraldi, M., Trombetta, A., Biasi, F., Canuto, R.A., Maggiora, M., Muzio, G. (2009) Decreased polyunsaturated Fatty Acid content contributes to increased survival in human colon cancer. *J Oncol.* **2009**, 867915-867924.
143. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. (2001) Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *J Biol Chem.* **276**, 12035-12040.
144. Zhao, S., Du, X.Y., Chai, M.Q., Chen, J.S., Zhou, Y.C., Song, J.G. (2002) Secretory phospholipase A(2) induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. *Biochim Biophys Acta* **1581**, 75-88.
145. Hammamieh, R., Sumaida, D., Zhang, X., Das, R., Jett, M. (2007) Control of the growth of human breast cancer cells in culture by manipulation of arachidonate metabolism. *BMC Cancer* **7**, 138-146.
146. Hughes-Fulford, M., Li, C.F., Boonyaratanakornkit, J., Sayyah, S. (2006) Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. *Cancer Res.* **66**, 1427-1433.

-
147. Faragó, N., Fehér, L.Z., Kitajka, K., Das, U.N., Puskás, L.G. (2011). MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. *Lipids Health Dis.* **10**, 173-180.
148. Lu, J., Caplan, M.S., Li, D., Jilling, T. (2008) Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, 1181-1190.
149. Pegorier, J. P., Le May, C., & Girard, J. (2004). Control of gene expression by fatty acids. *The Journal of Nutrition* **1348**, 24445–24495.
150. Robbins, D.J., Fei, D.L., Riobo, N.A. (2012) The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal.* **5**, re6. Review.
151. Lauth, M., Toftgård, R. (2007) Non-Canonical Activation of GLI Transcription Factors. *Cell Cycle* **6**, 2458-2463.
152. Dennler, S., André, J., Alexaki, I., Li, A., Magnaldo, T., Ten Dijke, P., Wang, X.J., Verrecchia, F., Mauviel, A. (2007) Activation of Sonic hedgehog mediators by TGF- β : Smad3/4-dependent induction of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **67**, 6981-6986.
153. Mancini, M., Toker, A. (2009) NFAT Proteins: Emerging Roles in Cancer Progression. *Nat Rev Cancer* **9**, 810–820.
154. König, A., Fernandez-Zapico, M.E., Ellenrieder, V. (2010) Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. *Pancreatology* **10**, 416-22.
155. Baumgart, S., Glesel, E., Singh, G., Chen, N.M., Reutlinger, K., Zhang, J., Billadeau, D.D., Fernandez-Zapico, M.E., Gress, T.M., Singh, S.K., Ellenrieder, V. (2012) Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. *Gastroenterology* **142**, 388-398.
156. Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., Hunt, D.F. (2006) Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3variants. *J Biol Chem.* **281**, 559-68.
157. Leslie, C.C. (2004) Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 1–17.
-

158. Moreira, L.S., Piva, B., Gentile, L.B., Mesquita-Santos, F.P., D'Avila, H., Maya-Monteiro, C.L., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., Diaz, B.L. (2009) Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**, 156–165.
159. Audi, N., Mesa, M.D., Martínez, M.A., Martínez-Victoria, E., Mañas, M., Yago, M.D. (2007) Membrane lipid composition of pancreatic AR42J cells: modification by exposure to different fatty acids. *Exp Biol Med.* **232**, 532-41.
160. Dai, J., Shen, J., Pan, W., Shen, S., Das, U.N. (2013) Effects of polyunsaturated fatty acids on the growth of gastric cancer cells in vitro. *Lipids Health Dis.* **12**, 71.
161. Turnell, R.W., Burton, A.F. (1975) Glucocorticoid receptors and lymphocytolysis in normal and neoplastic lymphocytes. *Mol Cell Biochem* **9**, 175–189.
162. Pan X, Wilson M, McConville C, Arvanitis TN, Griffin JL, Kauppinen RA, Peet AC. (2013) Increased unsaturation of lipids in cytoplasmic lipid droplets in DAOY cancer cells in response to cisplatin treatment. *Metabolomics* **9**, 722-729.
163. Dymkowska, D., Wojtczak, L. (2009) Arachidonic acid-induced apoptosis in rat hepatoma AS-30D cells is mediated by reactive oxygen species. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 711-715.
164. Das, U.N., Madhavi, N. (2011) Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis.***10**, 159-193.
165. Falconer, J.S., Ross, J.A., Fearon, K.C., Hawkins, R.A., O'Riordain, M.G., Carter, D.C. (1994) Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines. *Br. J. Cancer.* **69**, 826-832.
166. Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002) Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. *Journal Of Cellular Physiology* **192**, 1–15.
167. Yung-Chung H. and Margot M. (2011) Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptordependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. *Cell Signal* **23**, 2013–2020.
168. Naidu, M. R., Das, U. N., & Kishan, A. (1992). Intratumoral gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **45**, 181–184.

169. Xia, S.H., Wang, J., Kang, J.X. (2005). Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* **26**, 779–784.
170. Altenburg, J.D. and Siddiqui, R.A. (2008). Omega-3 polyunsaturated fatty acids down-modulate CXCR4 expression and function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecular Cancer Research* **7**, 1013–1020.
171. Barry, M., Cahill, R.A., Roche-Nagle, G., Neilan, T.G., Treumann, A., Harmey, J.H., Bouchier-Hayes DJ. (2009) Neoplasms escape selective COX-2 inhibition in an animal model of breast cancer. *Ir. J. Med. Sci.* **178**, 201–208.
172. Wenger, F.A., Kilian, M., Bisevac, M., Khodadayan, C., Von Seebach, M., Schimke, I., Guski, H., Müller, J.M. (2002) Effects of Celebrex and Zylflo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Clin. Exp. Metastasis* **19**, 681–687.