



Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 en el cambio de fenotipo de la agresividad tumoral en un modelo experimental de cáncer de pulmón: implicación de las oxilipinas

TESIS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

Mayra Remedios Montecillo Aguado

Directora de Tesis:

Dra. Sara Huerta Yopez / Investigadora jefa de la
Unidad en Investigación en Enfermedades
Hemato-oncológicas HIMFG

Comité Tutor:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta / Ciencias
Biomédicas

Dr. Mario I. Vega Paredes / Ciencias Biomédicas

Ciudad de México. Noviembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sara Huerta Yopez

Investigadora jefa de la Unidad en Investigación en Enfermedades Hemato-oncológicas HIMFG

ASESORES

Dr. Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Investigador Titular Ciencias Biomédicas

UNAM

Dr. Mario I. Vega Paredes
Investigador Titular

UNAM

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 6 |
| ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1.1 Cáncer de pulmón | 14 |
| 1.2 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) | 15 |
| 1.3 Consumo de PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en el mundo | 17 |
| 1.4 Efecto de los PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en cáncer de pulmón | 19 |
| 1.4.1 Estudios <i>in vitro</i> | 19 |
| 1.4.2 Estudios <i>in vivo</i> | 20 |
| 1.4.3 Estudios en pacientes | 22 |
| 1.5 Antecedentes directos | 23 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 25 |
| 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 4. HIPÓTESIS | 26 |
| 5. OBJETIVOS | 26 |
| 5.1 Objetivo general | 26 |
| 5.2 Objetivos particulares | 26 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 6.1 Línea celular | 26 |
| 6.2 Modelo experimental | 27 |
| 6.3 Tinción de hematoxilina eosina | 28 |
| 6.4 Índice mitótico | 29 |
| 6.5 Análisis inmunohistoquímico | 29 |
| 6.6 Patología digital y cuantificación de imagen automatizada | 30 |
| 6.7 Perfil de oxilipinas | 32 |

| | | |
|-----|---|----|
| 6.8 | Análisis de RT-PCR | 33 |
| 6.9 | Análisis estadístico | 34 |
| 7. | RESULTADOS | 34 |
| 7.1 | Un alto consumo de PUFA de ω -6 induce un fenotipo de alta agresividad | 34 |
| 7.2 | Una alta ingesta de PUFA de ω -6 induce un aumento en la expresión de citoqueratinas 5/6 y en la proliferación celular | 35 |
| 7.3 | El alto consumo de PUFA de ω -6 bloquea la apoptosis dependiente de caspasas | 37 |
| 7.4 | Los PUFA ω -6 incrementan la angiogénesis en el tejido tumoral | 38 |
| 7.5 | Perfil de oxilipinas inducidas por de ω -3 y ω -6 en el modelo experimental | 38 |
| 7.6 | Un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 induce la expresión de marcadores asociados a agresividad | 42 |
| 7.7 | Un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 induce la localización nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B | 44 |
| 8. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 44 |
| 9. | CONCLUSIÓN | 51 |
| 10. | PRODUCTOS OBTENIDOS | 52 |
| 11. | AGRADECIMIENTOS | 56 |
| 12. | FINANCIAMIENTO | 57 |
| 13. | BIBLIOGRAFÍA | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Página |
|-----------|---|--------|
| Figura 1 | Índice de mortalidad por cáncer de pulmón alrededor del mundo | 15 |
| Figura 2 | Vías de síntesis de oxilipinas a partir de EPA y ARA | 17 |
| Figura 3 | Los niveles de epóxidos de PUFA ω -6 y ω -3 impactan de manera negativa o positiva en el crecimiento tumoral y metástasis | 24 |
| Figura 4 | Evaluación de la histología tumoral de ratones tratados con TCDD y TPPU | 25 |
| Figura 5 | Modelo experimental del efecto de la dieta en el crecimiento tumoral | 28 |
| Figura 6 | Evaluación de la descripción histológica de los tumores teñidos con H&E | 35 |
| Figura 7 | Los PUFA de ω -6 inducen un fenotipo de mayor agresividad tumoral y un incremento de la proliferación celular | 36 |
| Figura 8 | El alto consumo de PUFA ω -6 inhibe la apoptosis dependiente de Caspasa-3, 8 y 9 | 37 |
| Figura 9 | Los PUFA de ω -6 inducen una mayor vascularización en el tumor | 38 |
| Figura 10 | La alta ingesta de PUFA de ω -6 induce la expresión de marcadores de agresividad | 43 |
| Figura 11 | La alta ingesta de PUFA de ω -6 induce la expresión del ARNm de marcadores de agresividad | 43 |
| Figura 12 | La alta ingesta de PUFA de ω -6 induce la expresión nuclear de NF κ B (p65) | 44 |
| Figura 13 | Modelo del efecto de los PUFAs de tipo ω -6 y ω -3 en la agresividad tumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón | 52 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | Página |
|------------|---|--------|
| Tabla I | Proporciones del consumo de PUFA de tipo ω -3/ ω -6 en diferentes poblaciones | 18 |
| Tabla II | Composición de ácidos grasos de las dietas | 27 |
| Tabla III | Anticuerpos usados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica | 30 |
| Tabla IV | Inputs tinción total | 31 |
| Tabla V | Inputs tinción nuclear | 32 |
| Tabla VI | Sondas usadas para la detección de ARNm por RT-PCR | 34 |
| Tabla VII | Niveles de oxilipinas ω -6 en plasma de ratones con dieta balanceada y rica en ω -6 | 40 |
| Tabla VIII | Niveles de oxilipinas ω -3 en plasma de ratones con dieta balanceada y rica en ω -6 | 41 |

ABREVIATURAS

| Abreviación | Significado |
|--------------------|---|
| A549 | Del inglés Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| AHR | Receptor de aril hidrocarbano del inglés Aryl hydrocarbon receptor |
| Akt | Proteína cinasa B del inglés Protein kinase B |
| ALA | Ácido alfa-linoleico del inglés α -linolenic acid |
| AMPK | Del inglés 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase |
| AP-1 | Proteína activadora 1 del inglés Activator protein 1 |
| ARA | Ácido araquidonico del inglés Arachidonic acid |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ASK1 | Del inglés Apoptosis signal-regulating kinase 1 |
| ATCC | Del inglés American Type Culture Collection |
| BID | Del inglés BH3 Interacting Domain Death Agonist |
| C20E | Del inglés Synthetic analogue of ω -3 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid |
| C57BL/6 | Del inglés C57 black 6 mice |
| Cas3a | Caspasa 3 activa |
| Cas8a | Caspasa 8 activa |
| Cas9a | Caspasa 9 activa |
| CD31 | Del inglés Platelet endothelial cell adhesion molecule |
| CD34 | Del inglés Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 |
| CK5/6 | Citokeratinas 5/6 |
| COX | Ciclooxigenasa del inglés Cyclooxygenase |
| CYP450 | Citocromo P450 del inglés Cytochrome P450 |
| CYP1 | Citocromo P450 Familia 1 del inglés Cytochrome P450 Family 1 |
| CYP2 | Citocromo P450 Familia 2 del inglés Cytochrome P450 Family 2 |
| CYP4 | Citocromo P450 Familia 4 del inglés Cytochrome P450 Family 4 |
| CYP4A11 | Citocromo P450 Familia 4 miembro 11 del inglés Cytochrome P450 Family 4 subfamily A member 11 |
| DGLA | Ácido dihomo gamma-linolénico del inglés Dihomo- γ -linolenic acid |

| | |
|----------------|---|
| DHA | Ácido docosahexaenoico del inglés Docosahexaenoic acid |
| DHEA | Docosahexanoil etanolamina del inglés Docosahexaenoyl ethanolamine |
| DiHDPE | Del inglés Dihydroxy-4Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosapentaenoic acids |
| DiHETE | Del inglés Dihydroxy eicosatetraenoic acids |
| DiHETrE | Del inglés Dihydroxy-5Z,8Z,14Z-eicosatrienoic acid |
| DMV | Densidad de microvasos |
| DpDPE | Del inglés Epoxy acids of Docosahexaenoic acid |
| EDP | Del inglés epoxydocosapentaenoic acid |
| EDP-EA | Del inglés DHEA-epoxides |
| EET | Ácidos epoxieicosatrienoicos del inglés Epoxy-eicosatrienoic acids |
| EHS | Epoxido hidrolasa soluble |
| EP2 | receptor 2 de la Prostaglandina E2 del inglés Prostaglandin E2 receptor 2 |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico del inglés Eicosapentaenoic acid |
| 16,17-EpDPE | Del inglés 16,17-Epoxy docosapentaenoic acid |
| 19,20-EpDPE | Del inglés 19,20-Epoxy docosapentaenoic acid |
| EpETEs | Ácidos epoxieicosatetraenoicos del inglés Epoxyeicosatetraenoic acids |
| ErbB2 | Del inglés Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2 |
| FGF2 | Factor 2 de crecimiento de fibroblastos del inglés Fibroblast Growth Factor 2 |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa del inglés Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GLA | Ácido gamma linolenico del inglés Gamma linolenic acid |
| HETE | Ácidos hidroxí eicosatetraenoicos del inglés Hydroxy-eicosatetraenoic acids |
| 12-HETE | Del inglés 12-Hydroxy-eicosatetraenoic acid |
| 14-HETE | Del inglés 14-Hydroxy-eicosatetraenoic acid |
| 20-HETE | Del inglés 20-Hydroxy-eicosatetraenoic acid |
| HEPE | ácidos hidroxí eicosapentaenoico del inglés Hydroxy-eicosapentaenoic acids |
| HIF-1 α | Factor 1-alfa inducible por hipoxia del inglés Hypoxia-inducible factor 1-alpha |
| HODEs | Ácidos hidroxí octadecadienoicos del inglés Hydroxyoctadecadienoic acids |

| | |
|------------------|---|
| HpETE | Del inglés Hydroperoxyl-eicosatetraenoic acids |
| HPLC-MS | Cromatografía líquida de alta resolución con espectrometro de masas del inglés High performance liquid chromatography |
| HRP | Peroxidasa de rabano del inglés Horseradish peroxidase |
| H&E | Hematoxilina y eosina del inglés Haematoxylin and eosin |
| IACUC | Del inglés Institutional Animal Care and Use Committee |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| JNK | Del inglés c-Jun N-terminal kinase |
| LA | Ácido linoleico del inglés Linolenic acid |
| LLC | Carcinoma de pulmón de Lewis del inglés Lewis lung carcinoma |
| LOX | Lipoxigenasa del inglés Lipoxygenase |
| LTB ₄ | Leucotrieno B ₄ del inglés Leukotriene B ₄ |
| LTB ₅ | Leucotrieno B ₅ del inglés Leukotriene B ₅ |
| LTC ₄ | Leucotrieno C ₄ del inglés Leukotriene C ₄ |
| LTC ₅ | Leucotrieno C ₅ del inglés Leukotriene C ₅ |
| LTD ₄ | Leucotrieno D ₄ del inglés Leukotriene D ₄ |
| LTD ₅ | Leucotrieno D ₅ del inglés Leukotriene D ₅ |
| LTs | Leucotrienos del inglés Leukotrienes |
| MAPK | Del inglés Mitogen-Activated Protein Kinases |
| MCM2 | Del inglés Mini-chromosome maintenance protein 2 |
| MKK4 | Del inglés Mitogen-activated protein kinase kinase 4 |
| MKP-1 | Del inglés Mitogen-activated protein kinase 1 |
| MMP-1 | Metaloproteínasa-1 de la matriz del inglés Matrix metalloproteinase-1 |
| MMP-9 | Metaloproteínasa-9 de la matriz del inglés Matrix metalloproteinase-9 |
| MOMP | Permeabilización de la membrana mitocondrial externa del inglés Mitochondrial outer membrane permeabilization |
| mPGES-1 | Del inglés Microsomal prostaglandin E synthase-1 |
| mTOR | Del inglés Mammalian target of rapamycin |
| NF-κB | Del inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NSCLC | Cáncer de pulmón de células no pequeñas del inglés Non-small cell lung cancer |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| 12-oxo-ETE | Del inglés 12-Oxoicosatetraenoic acid |

| | |
|------------------|---|
| PA | Ácido paquímico del inglés Pachymic acid |
| PAKt | Del inglés Phospho proteína quinasa B |
| PGD ₂ | Prostaglandina D2 del inglés Prostaglandin D ₂ |
| PGE ₂ | Prostaglandina E2 del inglés Prostaglandin E ₂ |
| PGF ₃ | Prostaglandina F3 del inglés Prostaglandin F ₃ |
| PGs | Prostaglandinas del inglés Prostaglandins |
| PPAR α | Del inglés Peroxisome proliferator activated receptor alpha |
| PPARb | Del inglés Peroxisome proliferator activated receptor beta |
| PUFA | Ácidos grasos poliinsaturados del inglés Polyunsaturated fatty acids |
| ω -3 PUFA | Ácidos grasos poliinsaturados ω -3 del inglés Omega-3-polyunsaturated fatty acids |
| ω -6 PUFA | Ácidos grasos poliinsaturados ω -6 del inglés Omega-6-polyunsaturated fatty acids |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno del inglés Reactive oxygen species |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real del inglés Real time polymerase chain reaction |
| Rv | Resolvina del inglés Resolvine |
| RvD1 | Resolvina D1 del inglés Resolvine D1 |
| RvD2 | Resolvina D2 del inglés Resolvine D2 |
| SNIEG | Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica |
| T-AUCB | Del inglés 4-(((1R, 4R)-4-(3-((3S, 5S, 7S)-adamantan-1-yl) ureido) cyclohexyl)oxy)benzoic acid |
| tBID | Del inglés Truncated Bid |
| TCDD | Del inglés 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin |
| TEM | Transición epitelio-mesenquima |
| TGF-b | Factor de crecimiento transformante beta del inglés Transforming growth factor beta |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa del inglés Tumor necrosis factor-alpha |
| TNFR1 | Receptor 1 de TNF del inglés TNF receptor 1 |
| TPPU | Del inglés 1-(1-Propionylpiperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl) urea |
| TXA ₂ | Tromboxano A2 del inglés Thromboxane A ₂ |
| TXB ₂ | Tromboxano B2 del inglés Thromboxane B ₂ |
| TXs | Tromboxanos del inglés Thromboxanes |

| | |
|--------|---|
| UCLA | Del inglés University of California, Los Angeles |
| VEGF-A | Factor de crecimiento vascular endotelial A del inglés Vascular Endothelial Growth Factor-A |
| YY1 | Factor de transcripción Yin Yang 1 |

RESUMEN

El cáncer de pulmón es actualmente el cáncer con mayor índice de mortalidad en todo el mundo, a menudo se diagnostica en una etapa avanzada y tiene un mal pronóstico. Se ha demostrado que la dieta es un factor importante que contribuye al riesgo y la mortalidad de varios tipos de cáncer. La ingesta de PUFA (ácidos grasos poliinsaturados del inglés Polyunsaturated fatty acids) de tipo ω -3 (omega 3) y ω -6 (omega 6) juega un papel importante en el riesgo y la progresión del cáncer. Las poblaciones occidentales actuales tienen un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 con una proporción ω -6/ ω -3 de 20:1. Este alto consumo de PUFA de tipo ω -6 está relacionado con un mayor riesgo y progresión del cáncer. Sin embargo, no se ha investigado si una dieta rica en PUFA de tipo ω -6 puede contribuir al cambio de fenotipo de agresividad tumoral. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos el efecto de una dieta rica en PUFA ω -6, en un modelo murino de carcinoma pulmonar y su relación con las oxilipinas. Los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaron un cambio de fenotipo en comparación con una dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1:1) o con la dieta control (ω -6/ ω -3 4:1), caracterizada por células poliédricas cuboides que presentan displasia, con núcleos enormes y nucleolos aparentes y acidófilos, así como un marcado aumento en la proliferación, la angiogénesis y los marcadores proinflamatorios, y una disminución en la expresión de proteínas proapoptóticas en sus tumores. El perfil de oxilipinas reveló un incremento de varias oxilipinas protumorales en los animales alimentados con una dieta rica en PUFA de tipo ω -6, incluidas PGs (prostaglandinas del inglés prostaglandins), HETEs (ácidos hidroxi eicosatetraenoicos del inglés hydroxy-eicosatetraenoic acids) y HODEs (ácidos hidroxi octadecadienoicos del inglés hydroxyoctadecadienoic acids). Estos resultados demuestran por primera vez que la alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 en la dieta aumenta la malignidad de las células tumorales por cambios histológicos que incluyen desdiferenciación tumoral, así como un aumento de la proliferación celular, la angiogénesis, y la expresión de marcadores como NF- κ B (Del inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), YY1 (factor de transcripción Yin Yang 1), COX-2 (ciclooxigenasa 2 del inglés cyclooxygenase 2) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta del inglés transforming growth factor beta).

ABSTRACT

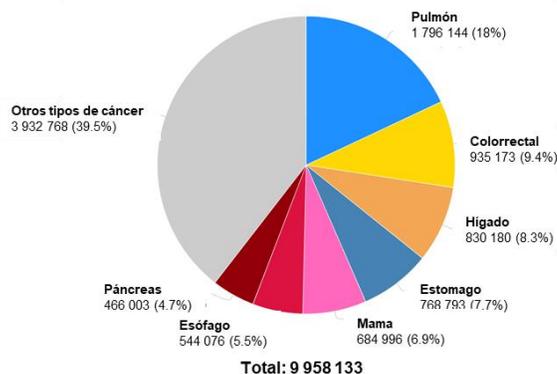
Lung cancer is currently the deadliest cancer worldwide, is often diagnosed at an advanced stage and has a poor prognosis. Diet has been shown to be an important factor contributing to the risk and mortality of several types of cancer. Intake of type ω -3 (omega-3) and ω -6 (omega-6) PUFAs (polyunsaturated fatty acids) plays an important role in cancer risk and progression. Current Western populations have a high intake of ω -6 type PUFAs with an ω -6/ ω -3 ratio of 20:1. This high consumption of type ω -6 PUFAs is related to an increased risk and progression of cancer. However, it has not been investigated whether a diet rich in ω -6 type PUFAs can contribute to the change in tumor aggressiveness phenotype. Therefore, in this study we evaluated the effect of a diet rich in ω -6 PUFA, in a murine model of lung carcinoma and its relationship with oxylipins. Mice fed a diet rich in ω -6 showed a change in phenotype compared to a balanced diet (ω -6/ ω -3 1:1) or the control diet (ω -6/ ω -3 4:1).), characterized by polyhedral cuboidal cells that present dysplasia, with enormous nuclei and apparent and acidophilic nucleoli, as well as a marked increase in proliferation, angiogenesis and proinflammatory markers, and a decrease in the expression of pro-apoptotic proteins. The oxylipin profile revealed an increase in several protumoral oxylipins in animals fed a diet rich in ω -6 PUFAs, including PGs (prostaglandins), HETEs (hydroxy-eicosatetraenoic acids), and HODEs (hydroxyoctadecadienoic acids). These results demonstrate for the first time that high intake of ω -6 type PUFA in the diet increases the malignancy of tumor cells by histological changes including tumor dedifferentiation, as well as increased cell proliferation, angiogenesis, and expression. of markers such as NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), YY1 (transcription factor Yin Yang 1), COX-2 (cyclooxygenase 2) and TGF- β (transforming growth factor beta).

1. INTRODUCCION

1.1 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer alrededor del mundo. En 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó 2, 206,771 nuevos casos y 1,796,144 muertes para ambos sexos (**Figura 1**) [1]. El cáncer de pulmón presenta una tasa de supervivencia a cinco años de un 56% cuando está localizado, cuando no es así se reduce a 18.6%. Únicamente el 16% de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados en una etapa temprana, cuando existe metástasis a otros órganos la tasa de supervivencia a cinco años se reduce a 5%, más de la mitad de los pacientes con cáncer de pulmón mueren dentro del primer año de diagnóstico [2]. En México, según un informe de SNIEG-INEGI en 2019, la tasa de defunción a causa de tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón ocupó los primeros lugares, representando el 8% de la población masculina de 30 a 59 años y el 11% de hombres con 60 años y más, así como el 7% de la población femenina de 60 años y más [3]. La mayoría de las neoplasias malignas de pulmón son carcinomas de pulmón de células no pequeñas (85%), que incluyen adenocarcinoma (60%), carcinoma epidermoide (20%) y carcinoma de células grandes (5%), el 15% restante corresponde a carcinomas de pulmón de células pequeñas [4]–[6]. A pesar de los avances en la detección y las mejoras en el estándar de atención, el cáncer de pulmón frecuentemente se diagnostica en una etapa avanzada y tiene un mal pronóstico [7]. Aunque la combinación de resección y quimioterapia, así como la inmunoterapia, pueden mejorar la supervivencia, el pronóstico del cáncer de pulmón sigue siendo malo [8], [9]. De manera relevante, la dieta es reconocida como un importante factor que repercute en el riesgo y mortalidad de varios tipos de cáncer [10]. Incluido el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de tipo ω -3 y ω -6 [11].

A Número estimado de muertes en 2020, alrededor del mundo, ambos sexos, todas las edades



B Tasas estimadas de mortalidad estandarizadas por edad alrededor del mundo en 2020, ambos sexos, todas las edades

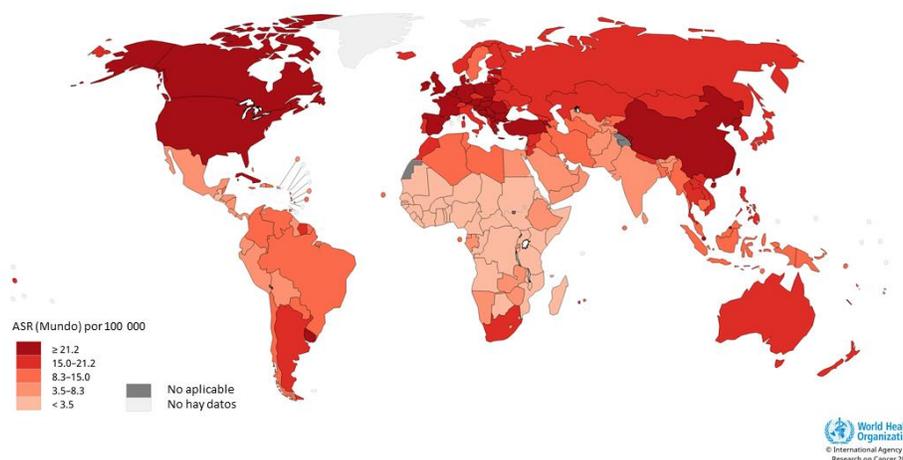


Figura 1. Índice de mortalidad por cáncer de pulmón alrededor del mundo. A. Gráfica de pastel con el número estimado de muertes en 2020, alrededor del mundo, ambos sexos, todas las edades. **B.** Tasas estimadas de mortalidad estandarizadas por edad alrededor del mundo en 2020, ambos sexos, todas las edades [1].

1.2 Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

Existen tres tipos de ácidos grasos naturales de acuerdo con el número de dobles enlaces carbono-carbono presentes en sus cadenas laterales: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (PUFA). En particular, los PUFA son ácidos grasos que contienen de 14 a 20 o más átomos de carbono con varios enlaces dobles. Los PUFA son una parte importante de los fosfolípidos de todas las membranas celulares [12]. En 1929, Burr y colaboradores demostraron que los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linoléico son componentes dietéticos esenciales [13], [14]. Los PUFA se clasifican como ácidos grasos de tipo ω -3 o ω -6 según la posición del primer enlace insaturado del grupo metilo

terminal. Los PUFA de tipo ω -3 incluyen el ácido α -linolénico (ALA) (18:3n-3), el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6n-3), mientras que los PUFA de tipo ω -6 incluyen principalmente el ácido linoleico (LA) (18:2n-6), el ácido γ -linolénico (GLA) (18:2n-6) y el ácido araquidónico (ARA) (20:4n-6). El LA es el ácido graso poliinsaturado más abundante en la naturaleza, y se puede encontrar principalmente en los aceites de semillas como la soja, girasol, cártamo y en el germen de trigo, uva, cáñamo, maíz y algodón. El ALA se encuentra en niveles elevados en vegetales de hojas verdes, semillas de lino, nueces y aceite de canola [15], [16]. El LA se puede convertir indirectamente en ARA en el cuerpo y es el principal PUFA en la dieta occidental, que comprende más del 85% de la ingesta de los PUFA [17]. El ALA se convierte *in vivo* en EPA y DHA [18]. El EPA y el DHA se encuentran en los mariscos y, en particular, en los aceites de salmón, atún, sardina, caballa y krill [19].

Los PUFA, por reacciones oxidativas, producen oxilipinas, las cuales son metabolitos esenciales en nuestro organismo. Existen tres vías que pueden formar las oxilipinas: la vía de la ciclooxigenasa (COX), la vía de la lipoxigenasa (LOX) y la vía del citocromo P450 (CYP450). El metabolismo de ARA a través de la vía COX genera prostaglandinas (PGE₂) y tromboxanos de la serie 2 (TXA₂) [20]. Mientras que el metabolismo de ARA a través de las vías LOX genera ácidos hidroperoxil-eicosatetraenoicos (HpETE), que se convierten rápidamente en ácidos grasos hidroxi-eicosatetraenoicos (5-12- y 15-HETE) empleando la glutatión peroxidasa. Los leucotrienos de la serie 4 (LTB₄, LTC₄, LTD₄) se generan al mismo tiempo [21]. Además, los leucotrienos de la serie 4 también se pueden generar a partir de 5-HpETE (ácido 5-hidroperoxil-eicosatetraenoico) mediante la vía de LOX [22]. La tercera vía involucra a las enzimas del citocromo P450, que pueden tener actividad ω -hidroxilasa o epoxigenasa. El metabolismo de ARA por la ω -hidroxilasa da como resultado la formación de 19- y 20-HETE (ácido 20-Hidroxi-eicosatetraenoico), mientras que la actividad de la epoxigenasa conduce a cuatro *cis*-ácidos epoxi-eicosatrienoicos (EETs) que pueden convertirse en ácidos dihidroxi-eicosatetraenoicos (DiHETEs) por la enzima epóxido hidroxilasa (EHs). Por otro lado, el EPA es el precursor de las prostaglandinas de la serie 3 (PGE₃, PGF₃), tromboxanos (TXA₃), resolvinas, protectinas y maresinas a través de la vía COX. Mientras que la vía LOX produce los leucotrienos de la serie 5 (LTB₅, LTC₅, LTD₅). La vía CYP450 a través de la ω -hidroxilasa genera HEPEs (ácidos hidroxi-eicosapentaenoicos) y la actividad de la epoxigenasa genera EpETEs (ácidos epoxieicosatetraenoicos), que se pueden convertir en ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DiHETE) [23] (**Figura 2**).

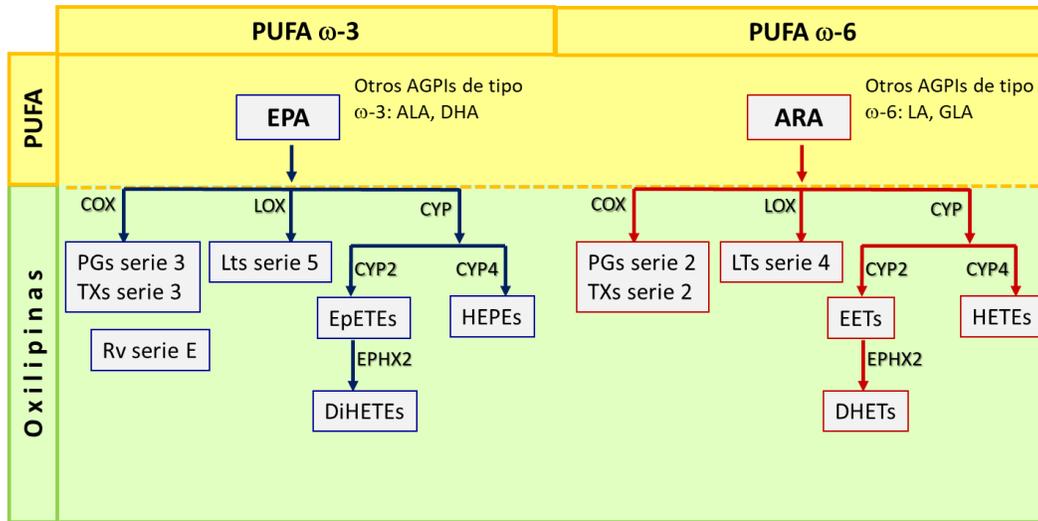


Figura 2. Vías de síntesis de oxilipinas a partir de EPA y ARA. Los ácidos grasos poliinsaturados de tipo ω -3 incluyen el ácido α -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), el metabolismo de EPA por la ciclooxigenasa (COX) conduce a la formación de prostaglandinas de serie 3 (PG) y tromboxanos de la serie 3 (TX), la vía de la lipoxigenasa (LOX) genera leucotrienos de la serie 5 (LT) y las epoxigenasas del citocromo P450 (CYP2) conducen a la formación de ácidos epoxieicosatetraenoicos (EpETEs), los EpETEs se metabolizan por la epóxido soluble hidrolasa (EHs) para formar los dioles de ácidos grasos denominados ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DiHETE), la CYP4 genera ácidos hidroxieicosapentaenoicos (HEPE). Por otro lado, los PUFA de tipo ω -6 incluyen el ácido linoleico (LA), el ácido γ -linolénico (GLA) y el ácido araquidónico (ARA). El metabolismo del ARA a través de la vía de COX genera prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) de serie 2, mientras que a través de la vía LOX genera leucotrienos de serie 4, la ω -hidroxilasa produce ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE), mientras que la actividad de la epoxigenasa conduce a ácidos epoxi-eicosatrienoicos (EET) que pueden convertirse en ácidos dihidroxieicosatetraenoicos (DiHET) mediante la enzima epoxi-hidroxilasa (sEH) [24].

1.3 Consumo de PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en el mundo

En general, se considera que una cantidad balanceada de PUFA en la dieta tiene efectos beneficiosos para la salud. Los PUFA de tipo ω -3 y ω -6 tienen efectos opuestos en las funciones metabólicas de nuestro cuerpo. Los derivados eicosanoides de ARA (PUFA de tipo ω -6) son generalmente proinflamatorios y están involucrados en varios procesos patológicos como la aterosclerosis, el asma bronquial y la enfermedad inflamatoria intestinal [25]. Los derivados de eicosanoides de EPA (PUFA de tipo ω -3) son predominantemente antiinflamatorios, pueden inhibir la agregación plaquetaria y son terapéuticos en algunas condiciones clínicas como enfermedades vasculares, hipertensión, diabetes mellitus, síndrome metabólico, psoriasis, eczema, dermatitis

atópica, enfermedad coronaria, cardiopatía coronaria, aterosclerosis y cáncer [23]. Por lo tanto, una proporción equilibrada de PUFA ω -3 y ω -6 en la dieta es necesaria para la salud.

La proporción dietética recomendada de PUFA ω -6/ ω -3 para obtener beneficios para la salud es de 1:1-2:1. Sin embargo, la población occidental actual tiene un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 (los alimentos ricos en PUFA ω -6 incluyen los aceites de semillas: soja, girasol, cártamo y en el germen de trigo, uva, cáñamo, maíz y algodón) [15], [16], con una proporción de ω -6/ ω -3 de 15:1 a 16,7:1 [26]. En México un estudio de 2011 reveló que la ingesta de ω -6/ ω -3 es de 18:1 [27]. Las estadísticas globales que cuantifican el consumo global de grasas y aceites dietéticos clave por país, edad y sexo entre 1990 y 2010 revelan que, en 2010, la ingesta media global de grasas ω -3 de pescados y mariscos fue de 163 mg/día, con una variación regional significativa (50 a 700 mg/día) y variación nacional (5 a 3 886 mg/día). Las ingestas más altas se observaron en Islandia (1189 mg/día), Barbados (1178 mg/día), Japón (995 mg/día), Maldivas, Seychelles, Dinamarca, Malasia, Corea del Sur y Tailandia [28]. En otro estudio global de 1980 a 2016, Stark y col., informaron que las regiones con altos niveles de EPA y DHA en la sangre (> 8%) incluyeron el este de Asia, Escandinavia y áreas con poblaciones indígenas o poblaciones que no se adaptaron completamente a los hábitos alimentarios occidentalizados. Por el contrario, se observaron niveles sanguíneos muy bajos de EPA (<4 %) en América del Norte, América Central y del Sur, Europa, Oriente Medio, Sudeste Asiático y África [29]. En los Estados Unidos, el consumo per cápita estimado de aceite de soja (la principal fuente de LA, ω -6) aumentó 1000 veces entre 1909 y 1999. La disponibilidad del LA aumentó del 2,79 % al 7,21 %, mientras que la disponibilidad de ALA (PUFA de tipo ω -3) aumentó del 0,39 % al 0,72 % De manera similar, la proporción de LA a ALA aumentó de 6.4 a 10.0 en el mismo siglo [30]. Estos estudios sugieren un bajo nivel de consumo de PUFA de tipo ω -3 en la mayor parte del mundo; este desequilibrio del consumo de ω -3/ ω -6 podría conducir potencialmente a problemas de salud (Tabla I).

Tabla I. Proporciones del consumo de PUFA de tipo ω -3/ ω -6 en diferentes poblaciones

| Población | ω -6/ ω -3 |
|-------------------------------|--------------------------|
| Grecia | 1-2:1 |
| Japón | 4:1 |
| Reino Unido y Norte de Europa | 15:1 |
| EUA | 20:1 |
| México | 18:1 |

1.4 Efecto de los PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en cáncer de pulmón

Estudios *in vitro*

Existen diversos estudios que han evaluado el efecto de los diferentes PUFA en distintos tipos de líneas celulares de cáncer de pulmón. Por ejemplo, Begin y col., informaron que el LA, GLA (ácido gamma-linolénico), DGLA (ácido dihomo-gamma-linolénico), ARA, ALA (ácido α -linoleico) y EPA causaron la muerte de las células de cáncer de pulmón A549, además ARA y EPA redujeron su tasa de proliferación [31]. Además, Trombetta y col., demostraron que el tratamiento con ARA y DHA redujo la proliferación de las células A549, el efecto se atribuyó a la peroxidación de lípidos, la inducción de PPAR β y (Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma), y la inhibición de AP-1 [32]. Por otro lado, Muzio y col., presentaron que la administración de EPA y DHA en células de cáncer de pulmón A427 también decrementaba el crecimiento celular e incrementaba la peroxidación de lípidos. Estos efectos se atribuyeron a un decremento de TNF α así como un incremento de PPAR α [33]. Conjuntamente, Zajdel y col., descubrieron que la actividad antitumoral de los PUFA de tipo ω -3 en células A549 está asociada con su capacidad para inducir especies reactivas de oxígeno (ROS) y desencadenar la apoptosis y la autofagia [34]. Además, Yin y col., encontraron que el DHA no solo induce la apoptosis en las células A549, sino que también suprime la invasión y metástasis. Todos estos efectos se asociaron con la producción de ROS en la células cancerosas [35]. Asimismo, Kim y col., describieron que el DHA induce la apoptosis a través de la inactivación de mTOR regulada por AMPK y Akt en células LLC [36]. Acorde con todos estos hallazgos, Serini y col., encontraron que el tratamiento con DHA en las células Mv1Lu, A549 y BEN indujo un efecto apoptótico mediado por la actividad de la fosfatasa MKP-1 [37].

Por otro lado, existen estudios que demuestran que las oxilipinas derivadas de estos PUFA tienen importantes efectos anti-tumorales. Por ejemplo, Yang y col., demostraron que el aumento de los niveles de PGE $_3$ se correlacionaba con un aumento de la proteína COX-2, así como con la inhibición de la proliferación de células A549 [38]. En un estudio complementario los autores señalan que la formación de PGE $_3$, inhibe el crecimiento tumoral al disminuir la fosforilación de la proteína quinasa B (PAKt) [39]. Además, Lee y col., observó que la resolvina D1 (RvD1) y la resolvina D2 (RvD2) inhiben la transición epitelio mesenquima (TEM) inducida por TGF- β 1 [40]. Otros estudios con líneas celulares

de cáncer de pulmón demuestran que EPA, DHA y sus prostaglandinas derivadas generan efectos anti-proliferativos e inducen apoptosis [41]. Además, en un estudio *in vitro*, Ling y colaboradores describieron que la inhibición del metabolismo de ARA por un triterpenoide natural, el ácido paquímico (PA) en células A549 produjo la inhibición del crecimiento, apoptosis y alteración del potencial de la membrana mitocondrial, en parte a través de la inhibición de las vías de señalización de MAPK y NF- κ B [42]. Conjuntamente, Xia y col., demostraron que la reducción de la relación PUFA ω -6/ ω -3 en las células A549 disminuyó su potencial invasivo, mediante la inhibición de varios genes relacionados con la adhesión/invasión (MMP-1, integrina-alfa2 y nm23- H4) [43]. Por el lado contrario, Yu y col., demostraron que la sobreexpresión de CYP450 ω -hidroxilasa CYP4A11 aumenta los niveles de 20-HETE, lo que promueve la angiogénesis y la metástasis mediante la regulación positiva de VEGF y MMP9 en células A549 [44].

En resumen, todos estos estudios con líneas celulares de cáncer de pulmón demuestran que los PUFA de tipo ω -3 y sus oxilipinas contribuyen a un efecto anti-tumoral principalmente mediado por una reducción de la proliferación y la invasión, así como un incremento en la apoptosis. Por el lado contrario los metabolitos de PUFA de tipo ω -6 promueven la angiogénesis y la metástasis ejerciendo un efecto pro-tumoral.

Estudios *in vivo*

Con respecto a los modelos experimentales, diversos grupos de trabajo han demostrado la participación de los PUFA en diversos procesos tumorales del cáncer de pulmón. Por ejemplo, Kim y col., presentaron en un modelo de cáncer de pulmón con ratones C57BL/6 que presentaban el gen transgénico Fat-1 (el cual produce PUFA de tipo ω -3 a partir de una dieta ω -6), que la administración de DHA induce un decremento del volumen tumoral así como apoptosis y autofagia en las células tumorales a través de la inactivación de mTOR regulada por AMPK y PI3K /Akt [36]. Además, Mouradian y col., indicaron en un modelo de xenoinjerto con células A549, que los animales alimentados con DHA presentaron una disminución del complejo HSP90-P23, asociándolo con niveles disminuidos de las proteínas ErbB2 y HIF-1 α [45]. Conjuntamente, Panigrahy y col., demostraron que la administración de los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) en un modelo de xenoinjerto con células LLC en ratones C57BL/6, estimulan el crecimiento del tumor primario, la metástasis multiorgánica y el escape de la latencia tumoral [46]. En un

estudio posterior, Zhang, G y colaboradores, evaluaron los efectos de los EDP y los EET en este mismo modelo murino. Cuando se coadministraron EDP y EET con un inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa, el ácido trans-4-[4-(3-adamantan-1-il-ureido)-ciclohexiloxi]-benzoico (t-AUCB), los 16,17-EpDPE y el 19,20-EpDPE inhibieron el crecimiento del tumor primario así como las metástasis, mientras que los EET aumentaron la angiogénesis y la progresión tumoral [47]. Por otro lado, Yang y col., presentaron en un modelo con ratones macho BALB/c (nu/nu) que los ácidos EPA y DHA inhiben la proliferación de células A549 (alta expresión de COX-2) en comparación con las células H1299 (baja expresión de COX-2), correlacionando los efectos antiproliferativos de los PUFA de tipo ω -3 con el nivel de la enzima COX-2 [48]. Conjuntamente, Mouradian y col., encontraron en un modelo con ratones macho Ncr (nu/nu) y células A549, que el aumento en la concentración de LA conduce a una mayor actividad de COX-2 y, por lo tanto, a una mayor producción de PGE₂, lo cual genera un incremento de la proliferación celular. Por el contrario, cuando se administró DHA se observó un efecto contrario, una disminución de la proliferación celular [49].

Además de los modelos que evalúan directamente la participación de los PUFA en el cáncer de pulmón, existen otros estudios que se han enfocado en otros tipos de cáncer, pero además evalúan las metástasis a pulmón. Entre estos estudios Goldfarb y col., analizó los efectos de los PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en un modelo de metástasis con células de adenocarcinoma mamario (MADB106) en ratas macho, encontrando una disminución de las metástasis pulmonares en las ratas que recibieron dieta rica en PUFA de tipo ω -3 en comparación con las alimentadas con ω -6. Además, describieron que las ratas alimentadas con una dieta rica en PUFA de tipo ω -3 tenían un mayor número de células NK y estas presentaban mayor citotoxicidad, mientras que los PUFA de tipo ω -6 generaban supresión de la actividad de estas células [50]. Similarmente, Roy y col., evaluaron el papel de la docosahexaenoil etanolamida (DHEA), un compuesto derivado del DHA, en un modelo de osteosarcoma, encontrando que el aumento de estos EDP-EA (epóxidos de docosahexaenoil etanolamida) presentan un efecto antiinflamatorio y antiangiogénico, así como una disminución de las metástasis en pulmón [51]. Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que los epóxidos derivados de la vía TCDD/AHR/CYP1s/sEH pueden impactar en el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo murino de carcinoma de pulmón, dependiendo de los niveles de PUFA de tipo ω -3 y ω -6 que consumían. Los ratones que recibieron una dieta rica en ω -6 (ω -6/ ω -3 20:1)

presentaron un incremento del volumen tumoral, así como de las metástasis a pulmón (estos efectos se atribuyeron al incremento en la proliferación y angiogénesis) mientras que los animales con dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1.1:1) presentaron una disminución del crecimiento tumoral e inhibición de metástasis (que se relacionó con un incremento en la apoptosis) [52].

En conclusión, las evidencias generadas en modelos experimentales con de cáncer de pulmón demuestra que los PUFA de tipo ω -6 y sus oxilipinas presentan un efecto pro-tumoral denotado por un incremento del volumen tumoral, metástasis, angiogénesis y proliferación celular. Por el lado contrario los PUFA de tipo ω -3 presentan un efecto contrario al inhibir estos procesos y además potenciar la apoptosis en los animales. Estos hallazgos son consistentes con los datos observados en los modelos *in vitro*.

Estudios en pacientes

Particularmente en estudios clínicos de cáncer de pulmón, el consumo de ω -3 se ha asociado con un incremento en la respuesta a la quimioterapia y una reducción en los efectos secundarios que esta ocasiona como anorexia, fatiga y sarcopenia [11], [53]–[55]. En este contexto, Murphy y col., informaron que los pacientes que recibieron suplementos de ácidos grasos de tipo ω -3 no presentaron sarcopenia en comparación con quien no recibió suplementación [56]. Además, Meij y col., analizaron los efectos de los PUFA de tipo ω -3 en 40 pacientes con NSCLC en etapa III, encontrando que los ácidos grasos de tipo ω -3 podían reducir la anorexia, la caquexia y la pérdida de peso, así como mejorar la concentración, la memoria [57], la ingesta nutricional y el balance energético [58]. Conjuntamente, un metaanálisis realizado por Liao y colaboradores concluyó que una dosis de alrededor de 1 gramo por día de EPA al 60% tiene efectos beneficiosos sobre la depresión en este tipo de pacientes [59]. Entre los mecanismos que apoyan los efectos antidepresivos de los PUFA de tipo ω -3, se encuentran la inhibición de citocinas proinflamatorias así como el mantenimiento de la integridad y fluidez de la membrana de las neuronas, lo que puede mejorar la neurotransmisión [60]. Los resultados de otros estudios demostraron que los PUFA de tipo ω -3 pueden tener un impacto beneficioso en el estado nutricional, la calidad de vida y la actividad física [57], [58], así como una reducción de los índices inflamatorio y oxidativo [61], y una disminución de la fatiga y la neuropatía en pacientes con NSCLC [62]. En el caso de los PUFA de tipo ω -6 Liu y

colaboradores, demostraron que los pacientes con adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón presentaban altos niveles de ARA, LA y sus metabolitos de tipo hidróxido en comparación con los controles asociándolos como posibles marcadores de la enfermedad [63].

Toda esta evidencia demuestra los efectos benéficos del consumo de los PUFA de tipo ω -3 en los pacientes con diferentes tipos de cáncer de pulmón durante la quimioterapia, que incluyen una disminución de la sarcopenia, caquexia, anorexia, ansiedad, depresión, y pérdida de peso entre otros, asociándolo con una mejora en su calidad de vida. Así mismo diferentes estudios han propuesto el consumo de PUFA de tipo ω -3 como una terapia complementaria que beneficia a los pacientes en la recuperación post cirugía. Por el lado contrario, los estudios con PUFA de tipo ω -6 en pacientes con cáncer de pulmón son más limitados y sólo se ha encontrado que existe un aumento de oxilipinas derivadas de estos ácidos grasos, por lo cual los autores los proponen como posibles marcadores de la enfermedad.

1.5 Antecedentes directos

Recientemente nuestro grupo de trabajo describió que los epóxidos derivados de la vía TCDD/AHR/CYP1s/sEH pueden impactar en el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo murino de carcinoma de pulmón, dependiendo de los niveles de PUFA de tipo ω -3 y ω -6 que consumían. Los ratones que recibieron una dieta rica en ω -6 (ω -6/ ω -3 20:1) presentaron un incremento del volumen tumoral, así como de las metástasis a pulmón (estos efectos se atribuyeron al incremento en la proliferación y angiogénesis) mientras que los animales con dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1.1:1) presentaron una disminución del crecimiento tumoral e inhibición de metástasis (que se relacionó con un incremento en la apoptosis). Estos efectos fueron atribuidos a la acumulación de epóxidos pues sólo cuando los ratones recibían TCDD (ligando del receptor de aril hidrocarburo y activador de la vía) y TPPU (inhibidor de la enzima epóxido hidrolasa) se podía observar el efecto. Esto fue comprobado al evaluar el perfil de oxilipinas por HPLC-MS, además este perfil reveló un incremento en los niveles de HETEs, LTB₄, LXA₄, PGE₂, PGE₄ en los ratones alimentados con dieta rica en ω -6, mientras que los animales con una dieta balanceada presentaron un aumento de EpETEs y DiHETEs lo cuales contribuyen al efecto observado en cada grupo de animales [52] (**Figura 3**).

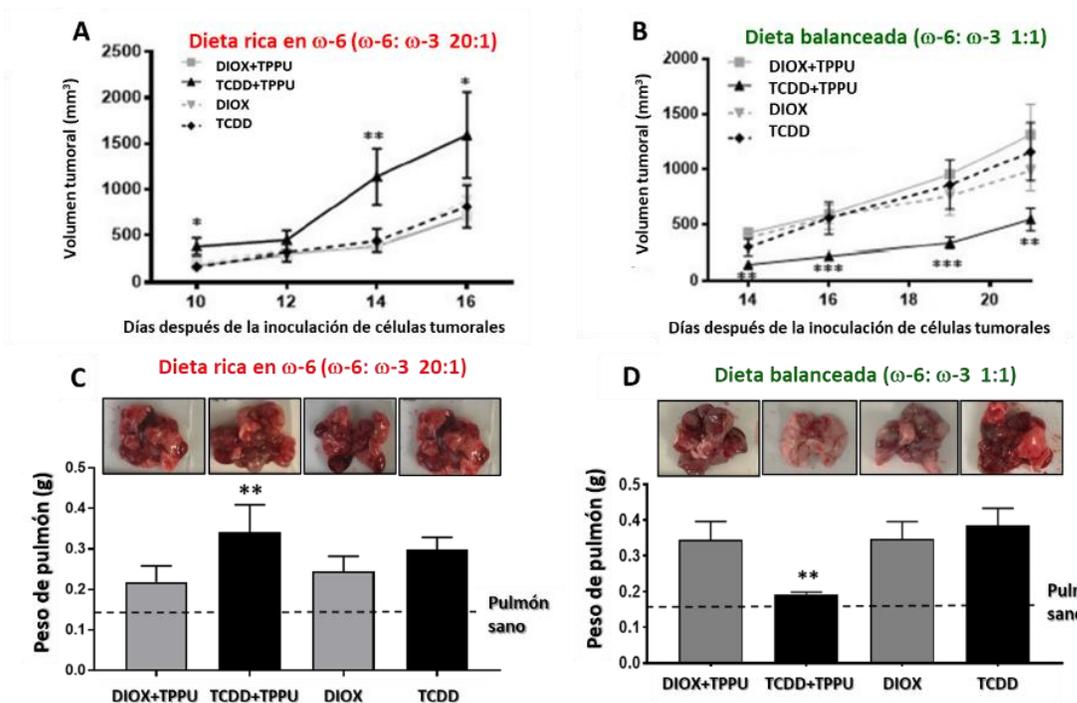


Figura 3. Los niveles de epóxidos de PUFA ω -6 y ω -3 impactan de manera negativa o positiva en el crecimiento tumoral y metástasis. Curvas del crecimiento tumoral de los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 **A.** y dieta balanceada **B.**, el volumen tumoral se midió cada tercer día. Evaluación de las metástasis en pulmón en ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 **C.** y dieta balanceada **D.**, la parte superior de las gráficas presenta imágenes representativas de los pulmones con metástasis, la línea punteada representa el peso de un pulmón sano. Los valores representan las medias \pm SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 [64] [52].

De manera muy interesante, durante el desarrollo del proyecto observamos que la morfología de las células tumorales era marcadamente diferente, cuando los ratones eran alimentados con una dieta balanceada en comparación con los animales que recibían una dieta rica en ω -6, sin importar la presencia de TCDD o TPPU. Los animales que recibieron una dieta rica en ω -6 desarrollaron tumores constituidos de células fusiformes con patrón sarcomatoide, esto correlacionó con el crecimiento rápido y presencia de metástasis en estos grupos de animales (**Figura 4**). Este hallazgo nos permitió plantear la hipótesis de si un alto consumo de PUFA de ω -6 generaba un fenotipo de mayor agresividad, y decidimos evaluar este fenómeno.

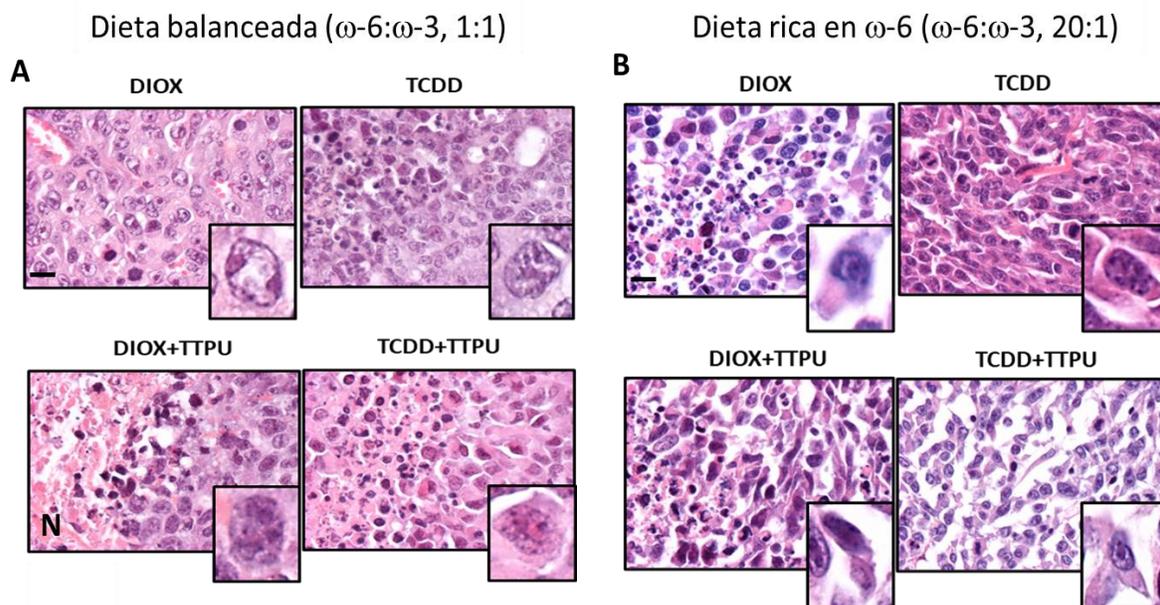


Figura 4. Evaluación de la histología tumoral de ratones tratados con TCDD (del inglés 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin) y TPPU (del inglés 1-(1-Propionylpiperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl) urea). Microfotografías representativas de hematoxilina-eosina de secciones de tumor de ratones tratados con Dioxano, TCDD, Dioxano+TPPU y TCDD+TPPU en los grupos de ratones alimentados con **A.** Dieta balanceada y **B.** Dieta rica en ω -6. Identificadores: (N) áreas de necrosis. Barra de escala: 10 μ m.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer. La dieta es reconocida como un importante factor que repercute en el riesgo y mortalidad de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón. Existen evidencias que demuestran que los metabolitos de PUFA de tipo ω -3 y ω 6 pueden impactar en la inhibición o progresión tumoral respectivamente. Esto es relevante pues la población occidental presenta un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 y esto pudiera repercutir en la inducción de un fenotipo de mayor agresividad en tumores de cáncer de pulmón. Por estos motivos, en la presente propuesta se evaluó el efecto de un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 en el cambio de fenotipo de agresividad tumoral en un modelo experimental de cáncer de pulmón.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 en el cambio de fenotipo de mayor agresividad tumoral en un modelo experimental de cáncer de pulmón?

4. HIPÓTESIS

Un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 (ω -6/ ω -3 20:1) induce un fenotipo de mayor agresividad en comparación una dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1:1) en un modelo de cáncer de pulmón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 en el cambio de fenotipo de agresividad tumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de una dieta rica en PUFA de ω -6 en los cambios de morfología del tejido tumoral.
2. Evaluar el efecto de una dieta rica en ω -6 en la proliferación celular en el tejido tumoral.
3. Evaluar el efecto de un alto consumo de PUFA de ω -6 en la apoptosis celular del tejido tumoral.
4. Evaluar el efecto de la dieta rica en PUFA de ω -6 en la inducción de la angiogénesis del tejido tumoral.
5. Determinar el perfil de oxilipinas generadas por el alto consumo de PUFA de tipo ω -6 y en el consumo de una dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1:1).
6. Analizar la expresión de los marcadores de agresividad YY1, COX-2 y TGF β en el tejido tumoral de ratones que recibieron una dieta rica en PUFA de ω -6.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Línea celular

La línea celular LLC fue adquirida de ATCC (Manassas, VA, EUA). Esta línea celular es un tipo de carcinoma epidermoide murino altamente maligno y extremadamente hemorrágico [65]. Las células LLC se cultivaron en medio esencial mínimo alfa (α -MEM) (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS) (Gibco) y antibiótico penicilina-estreptomina (Gibco). Para poder inocular a los animales las células tenían una viabilidad superior al 90% y se obtuvieron a partir de cultivos subconfluentes utilizando 0,05% de tripsina-EDTA (Gibco), la cual se neutralizo con medio de cultivo, las

células se lavaron 3 veces en medio α -MEM sin suero antes de suspenderlas en α -MEM libre de suero.

6.2 Modelo experimental

Se emplearon grupos de 10 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 5 semanas de edad para cada tratamiento, estos fueron alimentados durante todo el desarrollo experimental con dieta control (dieta comercial para ratones de bioterio) (ω -6/ ω -3 6.4:1) (Purina MO, EUA), dieta rica en ω -6 (ω -6/ ω -3 20:1) (Envigo, IN, EUA) o dieta balanceada (ω -6/ ω -3 1.1:1) (Envigo, IN, EUA) (**Tabla II**).

Tabla II. Composición de ácidos grasos de las dietas

| | Dieta control | Dieta balanceada | Dieta rica en ω -6 |
|---|---------------|------------------|---------------------------|
| Ácidos grasos saturados | 15.6 | 50.2 | 48.2 |
| Ácidos grasos monoinsaturados | 16.0 | 8.2 | 8.9 |
| Ácidos grasos poliinsaturados | 15.2 | 10.5 | 12.8 |
| Total de PUFA ω-3 | 1.9* | 4.1 | 0.5 |
| Acido alfa-linoleico (ALA) | --- | 0.3 | 0.2 |
| Acido eicosapentaenoico (EPA) | --- | 2.3 | 0.2 |
| Acido docosahexaenoico (DHA) | --- | 1.5 | 0.1 |
| Total de PUFA ω-6 | 12.3 | 5 | 12.2 |
| Acido linoleico (LA) | 12.2 | 4.7 | 11.9 |
| Acido araquidónico (ARA) | 0.1 | 0.3 | 0.3 |
| Proporción ω-6/ω-3 | 6.4:1 | 1.1:1 | 24.4:1 |

Acidos grasos (g/kg)

*La hoja técnica no especifica el tipo de PUFA de ω -3

Posterior al primer mes de alimentación, 5 de los ratones de cada grupo se sacrificaron y se obtuvo el plasma para la medición de oxilipinas por HPLC-MS (cromatografía de líquidos de alto rendimiento-espectrometría de masas, por sus siglas en inglés), los otros 5 animales fueron inoculados por vía subcutánea con 2×10^5 células LLC. Después de la aparición del tumor (aproximadamente 10 días), éste fue medido cada tercer día con ayuda de un vernier electrónico, el volumen fue determinado empleando la siguiente formula, $\text{volumen} = (L \times w^2) / 2 \times \frac{3}{4} \pi$, hasta alcanzar un volumen aproximado de 3000 mm³.

Cuando el volumen del tumor alcanzó dicha medida, los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el tumor que se dividió en dos partes: una para ensayos de histología y otra para RT-PCR (**Figura 5**). Los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de UCLA (IACUC) y del HIMFG, los animales fueron cuidados de acuerdo con las pautas institucionales.

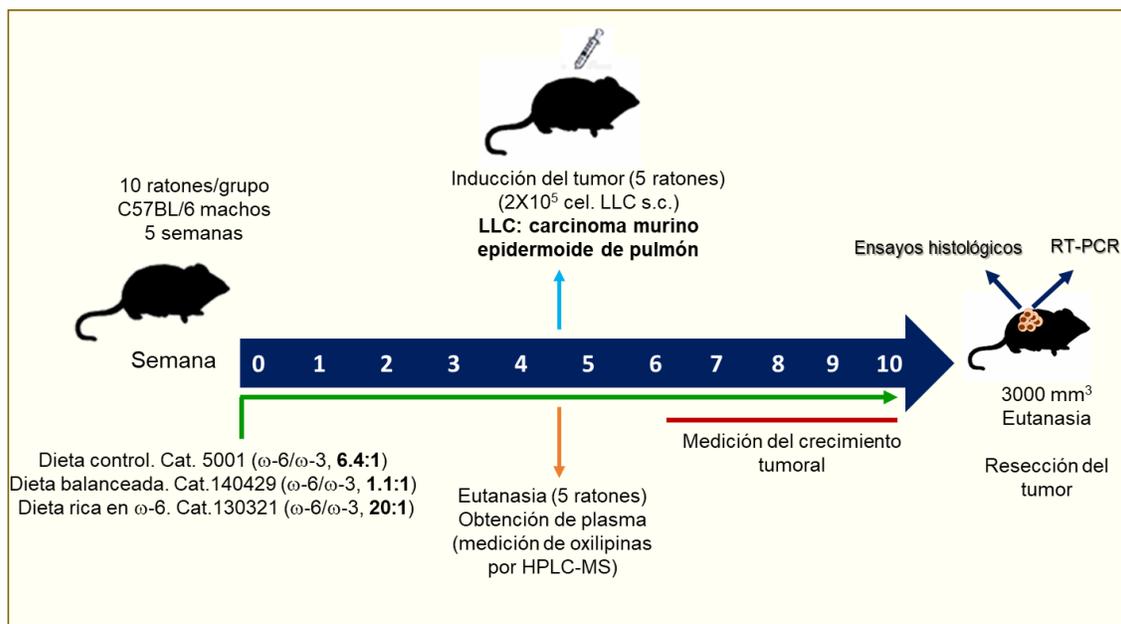


Figura 5. Modelo experimental del efecto de la dieta en el crecimiento tumoral. Ratones C57BL/6 machos recibieron dieta control, balanceada o rica en omega 6 (ω -6) durante todo el experimento. Después de cuatro semanas cinco de los ratones se sacrificaron y se obtuvo el plasma y pulmones para posterior análisis de oxilipinas por HPLC-MS. A los cinco animales restantes de manera subcutánea (sc) se les administraron 2×10^5 células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Se evaluó el volumen del tumor y cuando alcanzó un tamaño aproximadamente de 3000 mm^3 se sacrificaron los ratones, se resecó el tumor y se dividió en dos partes: una para ensayos de histología y otra para RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

6.3 Tinción de hematoxilina eosina

Brevemente, se desparafinaron secciones de $4 \mu\text{m}$ de tejido en xilol (J.T. Baker, Radnor, PA, EUA) y se rehidrataron a través de una serie de solventes (xileno, etanol al 100%, etanol al 90%, etanol al 70% y agua destilada). Posteriormente, las laminillas se sumergieron un minuto en hematoxilina, seguido de tres lavados en etanol-HCl, un lavado en agua, uno en etanol al 70% (JT Baker, Radnor, PA, EUA), posteriormente se sumergieron dos minutos en eosina y luego el tejido se deshidrató bajo los siguientes pasos: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno en baños de

5 minutos cada uno. Finalmente, los portaobjetos se cubrieron con resina, se colocó un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

6.4 Índice mitótico

De cada tejido tumoral teñido con hematoxilina y eosina (H&E), se tomaron 10 campos aleatorios con aumento de 40X y se contó el número de mitosis, luego se obtuvo el promedio y se reportó como índice mitótico, mediante la siguiente fórmula: Índice mitótico=Número de la mitosis/10.

6.5 Análisis inmunohistoquímico

Secciones de 4µm de tejido fueron desparafinadas en un horno a 95°C por 15 minutos y rehidratadas a través de una serie de solventes (xileno, etanol al 100%, etanol al 90%, etanol al 70% y agua destilada). Se realizó la recuperación del antígeno en un baño María a 94°C por 15 minutos con una solución de citrato 0.01 M a pH 6. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% (J.T. Baker) en metanol (J.T. Baker). Posteriormente, los tejidos se incubaron con anticuerpos primarios específicos (**Tabla III**) en una cámara húmeda a temperatura ambiente toda la noche. A continuación, las secciones se incubaron con el kit de detección de polímeros IgG anti-conejo ImmPRESS HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) y el sistema de detección DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina, deshidratados a través de la siguiente serie de solventes: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno, finalmente las laminillas fueron montadas con resina y se dejaron secar en un horno a 60°C.

Tabla III. Anticuerpos usados para la detección de proteínas por inmunohistoquímica

| Antígeno | Dilución | Compañía | Número de catalogo |
|-------------------|----------|--|--------------------|
| Caspasa-3 activa | 1:125 | Abcam (Cambridge, UK) | ab32042 |
| Caspasa-8 activa | 1:125 | Novus (Saint Charles, MO) | NB100-56116 |
| Caspasa-9 activa | 1:125 | Abgent (San Diego, CA) | AP7974a |
| CD31 | 1:1000 | Abcam | ab28364 |
| Citoqueratina 5/6 | 1:800 | Diagnostic Biosystems (Pleasanton, CA) | PDM123 |
| COX-2 | 1:500 | Novus | NB100-689 |
| MCM2 | 1:500 | Abcam | ab4461 |
| NFkB p65 | 1:100 | Abcam | ab7970 |
| TGF-β | 1:500 | Abcam | ab92486 |
| VEGF-A | 1:500 | Abcam | ab46154 |
| YY1 | 1:500 | Novus | NBP2-20932 |

6.6 Patología digital y cuantificación de la imagen automatizada

Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina, así como por inmunohistoquímica se digitalizaron utilizando el equipo Aperio ScanScope CS (Leica BioSystems, Nussloch, Germany). Las imágenes se revisaron empleando los softwares eSlide e ImageScope (Aperio, San Diego, CA, EUA). Para analizar y cuantificar la expresión de los marcadores para cada tejido se emplearon el algoritmo Positive pixel count (**Tabla IV**) y el algoritmo nuclear (**Tabla V**), cuyos inputs fueron previamente preconfigurados para la cuantificación de color café. Los algoritmos permiten cuantificar la saturación del color, así como identificar las intensidades de píxeles positivos clasificándolos en distintos rangos de intensidad: débiles (amarillo), moderados (naranja), fuertes (rojo) y negativos (azul). Los datos se presentan como intensidad total de píxeles/ μm^2 .

Tabla V. Inputs empleados para analizar la tinción total

| Input | Total 1 | Total 2 |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| View Width | 1000 | 1000 |
| View Height | 1000 | 1000 |
| Overlap size | 0 | 0 |
| Image zoom | 1 | 1 |
| Markup compression type | Same as processed image | Same as processed image |
| Compression quality | 30 | 30 |
| Classifier neighborhood | 0 | 0 |
| Classifier | None | None |
| Class list | | |
| Hue value | 0.1 | 0.1 |
| Hue width | 0.5 | 0.5 |
| Color saturation threshold | 0.04 | 0.04 |
| lwp (High) | 220 | 220 |
| lwp (Low)= lp (High) | 190 | 180 |
| lp (Low)= lsp (High) | 120 | 150 |
| lsp (Low) | 0 | 0 |
| lnp (High) | -1 | -1 |

Tabla V. Inputs empleados para analizar la tinción nuclear

| Input | Nuclear 1 | Nuclear 2 |
|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Min nuclear size (um ²) | 10 | 10 |
| Max nuclear size (um ²) | 1000 | 1000 |
| Min roundness | 0.01 | 0.1 |
| Min compactness | 0 | 0 |
| Min elongation | 0.4 | 0.1 |
| Remove light objects | 0 | 0 |
| Clear área intensity | 240 | 240 |
| Nuclear stain (red) | 0.94 | 0.94 |
| Nuclear stain (green) | 0.85 | 0.85 |
| Nuclear stain (blue) | 0.24 | 0.24 |
| Positive stain (red) | 0.42 | 0.42 |
| Positive stain (green) | 0.5 | 0.5 |
| Positive stain (blue) | 0.83 | 0.83 |
| Cytoplasmic intensity threshold | 230 | 230 |
| Weak (1+) threshold | 220 | 210 |
| Moderate (2+) threshold | 210 | 188 |
| Strong (3+) threshold | 195 | 162 |

6.7 Perfil de oxilipinas

Brevemente, 200 µL de plasma de ratones se enriquecieron con un estándar interno marcado con 9 isótopos antes de la extracción (PGD2-d4, 5-HETE-d8, 12-HETE-d8, 15-HETE-d8, 13-HODE-d4, 10 ng/mL cada uno) en metanol. Posteriormente, se agregaron 1,75 mL de agua (0,1% de ácido acético, pH 3,0). Las muestras se dejaron durante 15 minutos en hielo para una acidificación y equilibrio completos. Se usó la extracción en fase sólida (SPE) para limpiar las muestras y estas se eluyeron en cartuchos Oasis HLB SPE (Waters, Milford, MA, EUA), el cartucho SPE se equilibró con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua (ácido acético al 0,1 %, pH 3,0) antes de cargar la muestra. Después de cargar lentamente el cartucho, se lavó con 2 mL de metanol al 5% en agua (ácido acético al 0,1%). Los analitos de ácidos grasos se eluyeron posteriormente con 2

mL de metanol. A continuación, el eluyente se evaporó a sequedad bajo una corriente de argón. Posteriormente, los eluyentes se concentraron en un speedvac y se reconstituyeron en 50 µL de solución para las siguientes mediciones de LC/MS/MS.

Las mediciones de LC/MS/MS se realizaron en un sistema Sciex 6500+QTRAP (Sciex, Redwood, CA, EUA) asociado a un sistema Waters Acquity LC. El equipo se mantuvo a 4°C. La fase móvil A estaba constituida de agua con ácido acético glacial al 0,1%. La fase móvil B consistió en una mezcla de acetonitrilo/metanol (84:16) con ácido acético glacial al 0,1%. La elución en gradiente se realizó a un flujo de 250 µL/min. La cromatografía se optimizó para separar todos los analitos en 25 min según su polaridad, eluyendo primero los analitos más polares, como las prostaglandinas y los leucotrienos, seguidos por los ácidos grasos de tipo hidroxilado y epoxilado. El espectrómetro de masas se empleó en el modo MRM programado con fuente de iones de electropulverización. Todos los parámetros se optimizaron utilizando los estándares auténticos y la cuantificación se realizó contra la curva de calibración de soluciones de 0,25 a 800 nM [66]–[68].

6.8 Análisis de RT-PCR

De cada tejido tumoral congelado, se extrajo el ARN usando Trizol y cloroformo. Luego se usó 1 µg de ARN para la síntesis de ADNc en un volumen de 20 µL. Para la evaluación de genes, realizamos la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y usamos el kit Universal Taqman Master Mix II de Applied biosystems (Waltham, MA, EUA); todas las sondas TaqMan fueron obtenidas de Applied Biosystems (**Tabla VI**). El valor relativo de expresión de los genes se calculó utilizando el método ΔCt comparando la expresión de ARNm de COX-2, VEGF-A e YY1 relacionados con GAPDH como control endógeno.

Tabla VI. Sondas usadas para la detección de ARNm por RT-PCR

| Sonda | ID | Compañía |
|--------|---------------|----------------------------------|
| COX-2 | Mm03294838_g1 | Applied Biosystems (Waltham, MA) |
| VEGF-A | Mm00437306_m1 | Applied Biosystems |
| YY1 | Mm00456392_m1 | Applied Biosystems |
| GAPDH | Mm05724508_g1 | Applied Biosystems |

6.9 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SD o SEM y se analizaron usando una prueba U de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes entre sí. Se usó el análisis de Kruskal-Wallis para más de dos grupos independientes usando el software GraphPad Prism Versión 5.0 (San Diego, CA, EUA). Los niveles de significancia se indican de la siguiente manera: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7. RESULTADOS

7.1 Un alto consumo de PUFA de ω -6 induce un fenotipo de alta agresividad

Nuestro primer objetivo fue evaluar el efecto de la dieta rica en ω -6 en la morfología del tejido tumoral, encontrando que los tumores de ratones alimentados con dieta control presentan un carcinoma epidermoide diferenciado constituido por mantos de células poliédricas cuboides que presentan displasia, es decir son células grandes, con núcleos enormes y nucleolos aparentes y acidófilos, el tumor presenta además frecuentes figuras de mitosis, todas estas características son indicativas de moderada agresividad (**Figura 6A**). Los tumores de ratones alimentados con dieta balanceada presentan una apariencia histopatológica similar a los de dieta control, pero con frecuentes áreas focales de necrosis tisular (**Figura 6B**). Por el lado contrario los ratones alimentados con dieta rica en ω -6 desarrollan tumores pobremente diferenciados constituidos de mantos de células fusiformes con patrón sarcomatoide, estas células presentan cambios anaplásicos y displásicos severos (núcleo grande hipercromático basófilo, cúmulos de cromatina y nucleolo acidófilo), los tumores presentan grandes áreas de necrosis tisular e inflamación aguda, así como numerosas figuras de mitosis. Todas estas características histopatológicas son indicativas de dediferenciación y alta agresividad (**Figura 6C**). *Es particularmente interesante destacar que el alto consumo de PUFA de tipo ω -6 genera un cambio en las células adquiriendo una forma fusiforme con patrón sarcomatoide indicativa de un fenotipo de mayor agresividad.*

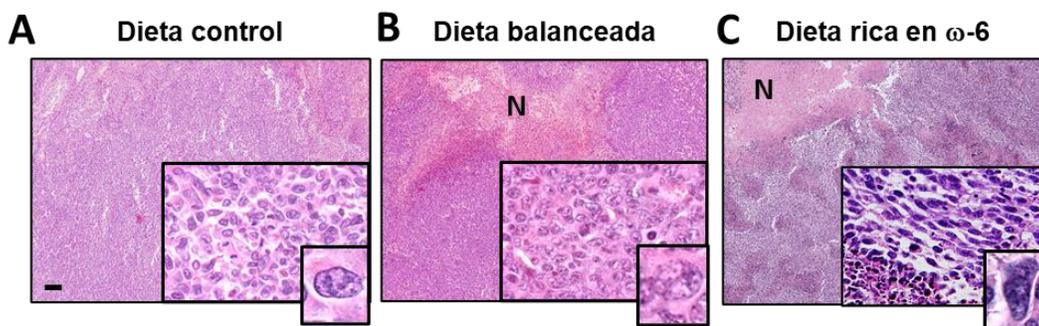


Figura 6. Evaluación de la descripción histológica de los tumores teñidos con hematoxilina-eosina. Microfotografías representativas de hematoxilina-eosina de secciones de tumor de los diferentes grupos de ratones alimentados con **A.** dieta control, **B.** dieta balanceada y **C.** dieta rica en ω -6. Identificadores: (N) áreas de necrosis. Barra de escala: 200 μ m.

7.2 Una alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 induce un aumento en la expresión de citoqueratinas 5/6 y en la proliferación celular

Se ha demostrado que la positividad de las Pan-citoqueratinas, permite confirmar el carácter carcinomatoso del tumor con predominio de células fusiformes o gigantes, incluyendo la expresión de las citoqueratinas 5 y 6 (CK5/6) [69]–[71]. Por lo tanto, medimos la expresión de estas citoqueratinas. En la **Figura 7A** se presentan microfotografías representativas de la inmunotinción de CK5/6. Encontramos una clara sobreexpresión de dichas citoqueratinas en el grupo de ratones alimentados con dieta rica en ω -6 en comparación con ratones alimentados con comida normal o con dieta balanceada, en los que observamos una débil tinción. El aumento de la expresión de CK5/6 fue estadísticamente significativo, $*p < 0,05$. *Estos hallazgos confirman la naturaleza epitelial de este carcinoma sarcomatoide y su desdiferenciación escamosa causada por la alta ingesta de PUFA ω -6.*

Dado que las áreas de necrosis están relacionadas con una alta actividad neoplásica proliferativa, que es un “hallmark” de los tumores altamente malignos, evaluamos la proliferación celular a través de la medición del índice de mitosis y la expresión de la proteína de mantenimiento del minicromosoma 2 (MCM2) por IHQ. Los ratones alimentados con dieta control presentan un 2.4 % de índice mitótico, muy similar al observado en los ratones alimentados con una dieta balanceada (2,6 %) (**Figura 7B**). Por el contrario, los tumores de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 exhibieron un mayor porcentaje de índice mitótico (6,6%) (** $p < 0,01$). Para validar estos resultados,

realizamos la detección de MCM2 por inmunotinción (**Figura 7C**). Como era esperado, los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaron una mayor expresión de MCM2 que los ratones alimentados con dietas control o balanceada (** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$, respectivamente). *Estos resultados revelan que los PUFA de ω -6 inducen un incremento en la proliferación celular lo cual puede estar ocasionando zonas de necrosis tisular, que es un marcador de una alta agresividad.*

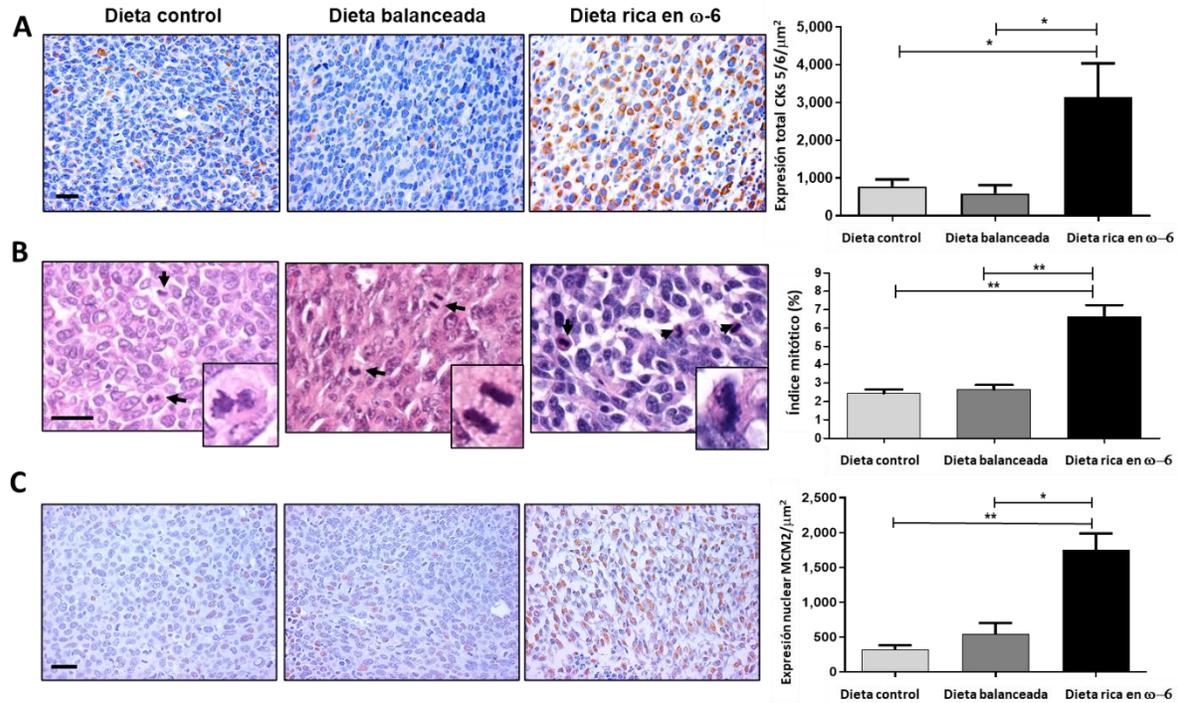


Figura 7. Los PUFA de ω -6 inducen un fenotipo de mayor agresividad tumoral y un incremento de la proliferación celular. **A.** Análisis de la expresión de citoqueratina 5/6 (* $p < 0.05$). **B.** Análisis del índice mitótico, se presentan las diferencias estadísticas (** $p < 0.01$). **C.** Análisis de la expresión de MCM2 (del inglés Mini-chromosome maintenance protein 2), se presentan las diferencias estadísticas (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$). Identificadores: (flechas negras) células que cursan por un proceso mitótico. (**A-C**) Barra de escala: 20 μ m. Los valores de las gráficas representan las medias \pm SEM, $n=5$.

7.3 El alto consumo de PUFA de ω -6 bloquea la apoptosis dependiente de caspasas

Debido a que en la evaluación histológica encontramos grandes áreas de necrosis, analizamos si los altos niveles de PUFA de ω -6 pudieran activar el proceso apoptótico y contribuir a las zonas de muerte celular. Por lo tanto, se analizó la expresión de las caspasas 8, 9 y 3 activas, nuestros resultados demostraron un incremento significativo de las caspasas activas 3 (**Figura 8A**) (* $p < 0.05$), 8 (**Figura 8B**) (* $p < 0.05$) y 9 (**Figura 8C**)

(* $p < 0.05$) en el grupo de ratones alimentado con dieta balanceada en comparación con los que recibieron dieta control o rica en ω -6. Contrario a lo informado en la literatura que los PUFA de tipo ω -6 inducen un efecto pro-apoptótico [72], en nuestro modelo encontramos una mínima activación de ambas caspasas. *Estos datos sugieren que los PUFA de tipo ω -6 podrían estar inhibiendo la apoptosis dependiente de las caspasas 8 (vía extrínseca), 9 (vía intrínseca) y 3, explicando en parte el incremento de agresividad tumoral en nuestro modelo experimental.*

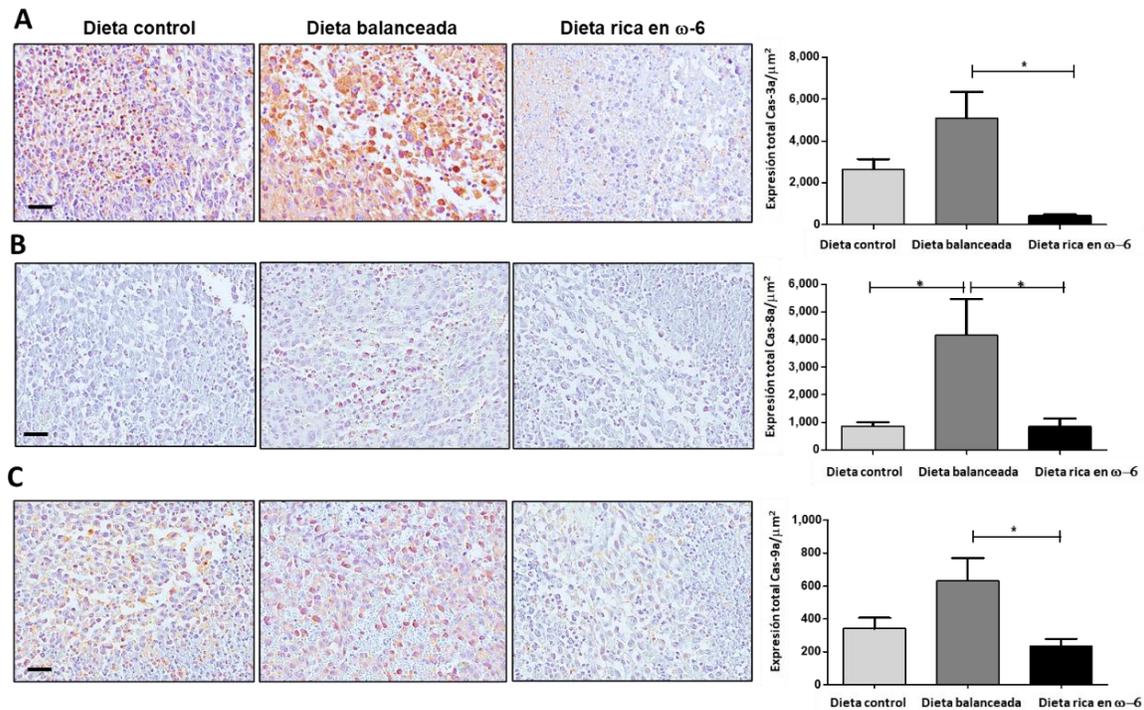


Figura 8. El alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 inhibe la apoptosis dependiente de Caspasa-3, 8 y 9. A. Microfotografías representativas y análisis de la expresión de caspasa 3 activa analizada por inmunohistoquímica, (* $p < 0.05$). **B.** Inmunotinción de caspasa 9 activa, (* $p < 0.05$). **C.** Inmunotinción de caspasa 8 activa, (* $p < 0.05$). Barra de escala: 20 μ m. Los valores representan las medias \pm SEM, $n = 5$.

7.4 Los PUFA ω -6 incrementan la angiogénesis en el tejido tumoral

La angiogénesis es un marcador de agresividad tumoral por tanto evaluamos el efecto del alto consumo de PUFA de tipo ω -6 en el proceso angiogénico. Analizamos la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A), el cual es clave en angiogénesis. En la **Figura 9A** se presentan microfotografías representativas de la tinción de VEGF-A en los tumores, en donde observamos una alta expresión de esta proteína en

los tumores de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 comparado con aquellos que recibieron dieta control y balanceada ($*p<0.05$ y $**p<0.01$, respectivamente). Para complementar este hallazgo, se evaluó la cantidad de vasos sanguíneos por cm^2 a través del marcador CD31, consistente con el resultado anterior encontramos que el grupo de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presenta un mayor número de vasos sanguíneos comparado con los otros grupos ($**p<0.01$ y $*p<0.05$, respectivamente) (**Figura 9B**). *Estos datos sugieren que el alto consumo de PUFA de ω -6 inducen un aumento en la angiogénesis del tejido tumoral que es un marcador de mayor agresividad.*

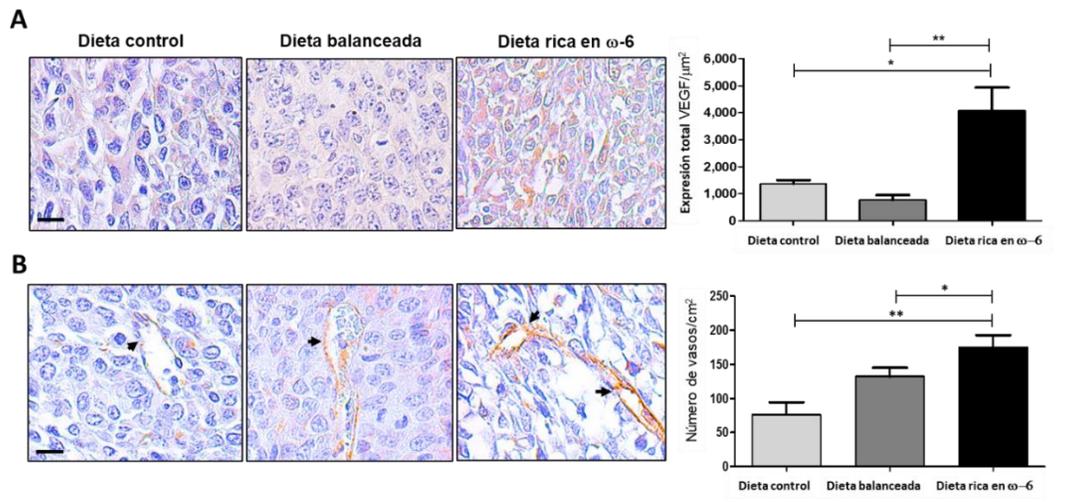


Figura 9. Los ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 inducen una mayor vascularización en el tumor. A. Ejemplo representativo de secciones tumorales y análisis de la expresión de VEGF-A, ($*p<0.05$ y $**p<0.01$, respectivamente). **B.** Cuantificación de vasos sanguíneos inmunotñidos con CD31, en los diferentes grupos de ratones alimentados con dieta control, dieta balanceada y dieta rica en ω -6, en la parte izquierda se presentan microfotografías representativas de los vasos sanguíneos denotados por flechas negras, parte derecha, se presenta el análisis de los vasos sanguíneos por cm^2 , ($**p<0.01$ y $*p<0.05$, respectivamente). Barra de escala: 20 μm . Los valores representan las medias \pm SEM, $n=5$.

7.5 Perfil de oxilipinas inducidas por de ω -3 y ω -6 en el modelo experimental

De acuerdo con nuestros datos recientemente descritos acerca de participación de las oxilipinas en el crecimiento tumoral y la metástasis, y con el propósito de complementar los datos obtenidos, analizamos el perfil de oxilipinas implicado en el cambio de fenotipo de agresividad tumoral. Debido a que la mayor diferencia se observó entre los grupos de animales que recibieron una dieta balanceada y rica en ω -6, evaluamos en estos grupos de animales los niveles de 66 oxilipinas en colaboración con la Universidad de California,

Davis, USA, a través de HPLC-MS, en el plasma de cinco animales por grupo alimentados por cuatro semanas sin inducir el tumor, para evaluar el nivel basal de oxilipinas que la dieta genera en los animales y que pueda repercutir en el desarrollo del tumor. Comparamos los niveles de oxilipinas entre ambas dietas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las oxilipinas se clasificaron según el ácido graso poliinsaturado del cual derivan y de la ruta enzimática (**Tablas VII y VIII**). Curiosamente, los ratones alimentados con dietas ricas en ω -6 mostraron niveles más altos de oxilipinas derivadas de las vías COX y LOX en comparación con las oxilipinas derivadas de la vía de CYP450 en plasma. Las oxilipinas originadas a partir de ARA que aumentaron a través de la vía COX incluyeron el tromboxano B₂ (TXB₂) y la prostaglandina D₂ (PGD₂). Los productos de lipoxigenasa incluían la lipoxina A₄ (LXA₄), el ácido 12-oxoeicosatetraenoico (12-oxo-ETE) y los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). La vía del citocromo P450 presentó aumento de los dioles (DiHETrEs). Asimismo, LA presentó altos niveles de ácidos hidroxi octadecaenoicos (HODEs), ácidos apoxi-octadecenoicos (EpOMEs) y ácidos dihidroxioctadecadienoicos (DiHOMEs), aunque estos no fueron significativos (**Tabla VII**).

Además, los ratones alimentados con una dieta balanceada presentaron niveles más altos de oxilipinas derivadas de la ruta de CYP450 en comparación con las rutas de COX y LOX en plasma. Las oxilipinas derivadas de EPA que aumentaron a través de la vía COX incluyeron la prostaglandina D₃ (PGD₃). Además, existió un aumento de los niveles de los ácidos hidroxieicosapentaenoicos (HEPEs) bajo la vía LOX. Y la vía del citocromo P450 mostró altos niveles de epóxidos (EpETEs) y dioles (DiHETE). Asimismo, el DHA presentó un aumento de epóxidos (DpDPE) y dioles (DiHDPE) derivados de la vía CYP450. Todos los cambios de los ratones alimentados con dieta balanceada se presentan en la **Tabla VIII**. *Estos datos revelan que la dieta está generando un microambiente de oxilipinas que puede influir en la agresividad del tumor. Estos resultados sugieren que las oxilipinas derivadas de la dieta rica en ω -6 pueden estar implicadas en el cambio de fenotipo de agresividad tumoral.*

Tabla VII. Niveles de oxilipinas ω -6 en plasma de ratones con dieta balanceada y rica en ω -6

| PUFA ω -6 | Enzima | Oxilipinas | Dieta balanceada (μ mol/L) | Dieta rica en ω -6 (μ mol/L) | Valor P |
|-------------------|---------------|--------------------------|---------------------------------|--|----------------|
| LA | COX | --- | --- | --- | --- |
| | LOX | 9-HODE | 2654.3 \pm 174.1 | 10285.5 \pm 612.4 | *** |
| | | 13-HODE | 2097.4 \pm 112.5 | 8985.5 \pm 473.2 | *** |
| | | 9,10,13-TriHOME | 112.9 \pm 38.5 | 152.3 \pm 15.9 | ns |
| | | 9,12,13-TriHOME | 192.9 \pm 63.2 | 276.9 \pm 33.7 | ns |
| | CYP450 | 9,10-EpOME | 829.5 \pm 229.9 | 1150.9 \pm 341.1 | ns |
| | | 12,13-EpOME | 654.8 \pm 195.3 | 995.2 \pm 311.0 | ns |
| | | 9,10-DiHOME | 11.3 \pm 3.5 | 13.5 \pm 3.0 | ns |
| | | 12,13-DiHOME | 13.1 \pm 3.4 | 21.0 \pm 11.1 | ns |
| | ARA | COX | TXB ₂ | 11.0 \pm 3.5 | 28.2 \pm 9.4 |
| PGD ₂ | | | 0.2 \pm 0.06 | 0.5 \pm 0.1 | * |
| PGF _{2a} | | | 1.0 \pm 0.2 | 2.1 \pm 0.7 | ns |
| PGE ₂ | | | 0.3 \pm 0.04 | 0.6 \pm 0.2 | ns |
| LOX | | LXA ₄ | 3.0 \pm 1.2 | 7.9 \pm 2.5 | * |
| | | LTB ₄ | 0.7 \pm 0.3 | 1.5 \pm 0.6 | ns |
| | | 6-trans-LTB ₄ | 0.3 \pm 0.09 | 0.5 \pm 0.4 | ns |
| | | 5-oxo-EETE | 20.9 \pm 4.7 | 56.7 \pm 5.1 | ns |
| | | 12-oxo-EETE | 142.5 \pm 60.4 | 534.6 \pm 177.1 | * |
| | | 15-oxo-EETE | 7.9 \pm 1.9 | 17.1 \pm 5.7 | ns |
| | | 5-HETE | 22.2 \pm 8.8 | 29.7 \pm 8.7 | ns |
| | | 8-HETE | 11.6 \pm 3.5 | 24.9 \pm 7.2 | ns |
| | | 9-HETE | 0.01 \pm 0.001 | 1.2 \pm 0.4 | *** |
| | | 11-HETE | 17.8 \pm 6.4 | 38.0 \pm 14.6 | ns |
| | | 12-HETE | 325.1 \pm 201.1 | 1751.8 \pm 400.1 | ** |
| | | 15-HETE | 22.9 \pm 7.9 | 48.9 \pm 17.7 | ns |
| CYP450 | | 20-HETE | 0.2 \pm 0.04 | 0.3 \pm 0.06 | ns |
| | | 5,6-EpETrE | 932.2 \pm 207.2 | 1431.2 \pm 418.8 | ns |
| | | 8,9-EpETrE | 412.2 \pm 144.1 | 583.6 \pm 156.7 | ns |
| | | 11,12-EpETrE | 197.1 \pm 43.1 | 271.7 \pm 75.3 | ns |
| | 14,15-EpETrE | 130.9 \pm 27.6 | 183.4 \pm 52.0 | ns | |
| | 5,6-DiHETrE | 0.6 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.1 | ** | |
| | 8,9-DiHETrE | 0.7 \pm 0.2 | 1.6 \pm 0.1 | * | |
| | 11,12-DiHETrE | 0.4 \pm 0.1 | 0.8 \pm 0.1 | ns | |
| 14,15-DiHETrE | 0.8 \pm 0.2 | 1.5 \pm 0.2 | * | | |

Tabla VIII. Niveles de oxilipinas ω -3 en plasma de ratones con dieta balanceada y rica en ω -6

| PUFA ω -3 | Enzima | Oxilipinas | Dieta balanceada (μ mol/L) | Dieta rica en ω -6 (μ mol/L) | Valor P |
|------------------|---------------|------------------|---------------------------------|--|---------|
| ALA | COX | --- | --- | --- | --- |
| | LOX | 9-HOTrE | 7.4 \pm 2.5 | 6.3 \pm 1.0 | ns |
| | | 13-HOTrE | 7.6 \pm 1.6 | 0.2 \pm 0.03 | ** |
| | CYP450 | 9,10-EpODE | 55.9 \pm 22.0 | 18.0 \pm 4.5 | ns |
| | | 12,13-EpODE | 45.7 \pm 18.1 | 14.8 \pm 3.8 | ns |
| | | 15,16-EpODE | 112.5 \pm 46.9 | 43.1 \pm 10.1 | ns |
| | | 9,10-DiHODE | 0.3 \pm 0.1 | 0.2 \pm 0.1 | ns |
| | | 12,13-DiHODE | 2352.3 \pm 718.6 | 1686.7 \pm 239.4 | ns |
| 15,16-DiHODE | | 2.0 \pm 0.2 | 2.4 \pm 0.2 | ns | |
| EPA | COX | PGD ₃ | 0.3 \pm 0.1 | 0.08 \pm 0.02 | * |
| | LOX | 5-HEPE | 42.3 \pm 19.5 | 4.1 \pm 1.4 | * |
| | | 8-HEPE | 33.4 \pm 12.4 | 1.5 \pm 0.7 | * |
| | | 12-HEPE | 373.5 \pm 204.1 | 103.5 \pm 14.5 | ns |
| | | 15-HEPE | 73.4 \pm 33.2 | 10.0 \pm 2.7 | * |
| | CYP450 | 8,9-EpETE | 131.7 \pm 34.4 | 5.2 \pm 1.7 | ** |
| | | 11,12-EpETE | 106.7 \pm 27.1 | 6.0 \pm 1.2 | ** |
| | | 14,15-EpETE | 184.4 \pm 44.0 | 10.2 \pm 1.7 | ** |
| | | 17,18-EpETE | 226.2 \pm 55.8 | 14.4 \pm 3.0 | *** |
| | | 8,9-DiHETE | 1.0 \pm 0.1 | 0.9 \pm 0.4 | ns |
| | | 11,12-DiHETE | 0.6 \pm 0.05 | 0.09 \pm 0.02 | *** |
| | | 14,15-DiHETE | 0.8 \pm 0.1 | 0.1 \pm 0.02 | ** |
| | | 17,18-DiHETE | 3.9 \pm 0.7 | 1.4 \pm 0.2 | ** |
| DHA | COX | --- | --- | --- | --- |
| | LOX | 17-HDoHE | 786.3 \pm 412.2 | 240.9 \pm 39.8 | ns |
| | CYP450 | 7,8-EpDPE | 5353.7 \pm 1520.7 | 1207.2 \pm 319.2 | * |
| | | 10,11-EpDPE | 398.5 \pm 117.1 | 91.0 \pm 22.6 | * |
| | | 13,14-EpDPE | 256.5 \pm 74.3 | 58.2 \pm 14.5 | * |
| | | 16,17-EpDPE | 253.3 \pm 79.4 | 54.4 \pm 13.7 | * |
| | | 19,20-EpDPE | 325.1 \pm 102.2 | 61.0 \pm 17.2 | * |
| | | 4,5-DiHDPE | 6.1 \pm 3.7 | 1.4 \pm 0.2 | ns |
| | | 7,8-DiHDPE | 4550.1 \pm 771.2 | 463.9 \pm 165.8 | ** |
| | | 10,11-DiHDPE | 1.2 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | * |
| | | 13,14-DiHDPE | 1.0 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.02 | * |
| | | 16,17-DiHDPE | 2.0 \pm 0.4 | 0.7 \pm 0.09 | * |
| | | 19,20-DiHDPE | 17.7 \pm 7.1 | 4.9 \pm 0.4 | * |

7.6 Un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 induce la expresión de marcadores asociados a agresividad

Nuestro grupo de investigación entre otros, ha descrito que el factor de transcripción Yin-Yang-1 (YY1), está implicado en los mecanismos de agresividad tumoral, metástasis y resistencia a la quimioterapia [73], [74]. Para dar soporte a nuestros hallazgos evaluamos la expresión del factor de transcripción YY1, del cual Huang y colaboradores asociaron su alta expresión con tumores de gran tamaño, pobre diferenciación y metástasis a nódulos linfoides en pacientes con cáncer de pulmón [75]. De forma importante encontramos que el grupo alimentado con dieta rica en ω -6 presenta un incremento en la expresión de este marcador con respecto a los otros grupos (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$, respectivamente) (**Figura 10A**). También, evaluamos la expresión de COX-2 (**Figura 10B**) y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (**Figura 10C**) (* $p < 0.05$), los cuales están asociados a procesos proinflamatorios y de transición epitelio mesénquima respectivamente, además ambas proteínas son reguladas transcripcionalmente por YY1. Acorde con el resultado anterior el grupo alimentado con dieta rica en ω -6 presenta mayor expresión de ambos marcadores en comparación con los otros grupos. Para confirmar estos datos se evaluó la expresión del ARNm de YY1, COX-2 y VEGF-A (* $p < 0.05$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, respectivamente) (**Figura 11**), consistente con los resultados de la inmunohistoquímica, encontramos un incremento del ARNm en el grupo de ratones alimentado con una dieta rica en PUFA de ω -6. *Demostrando por primera vez que una alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 incrementa la expresión y activación de YY1, potenciando el fenotipo de agresividad en este grupo de animales.*

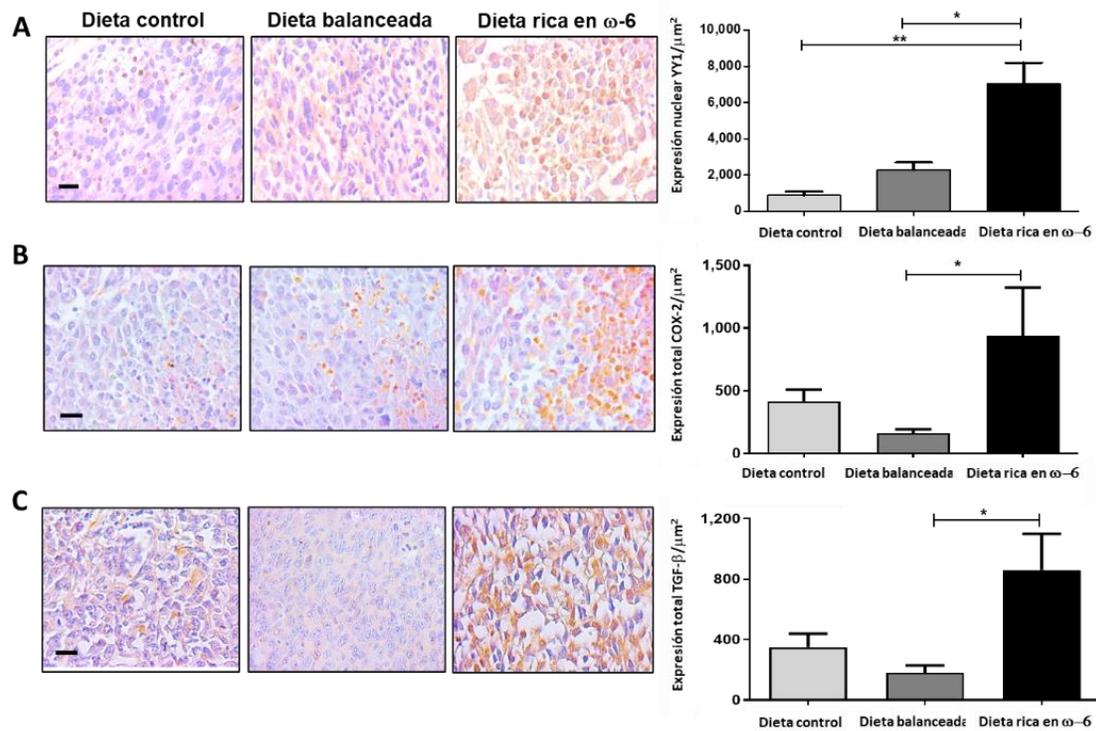


Figura 10. La alta ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 induce la expresión de marcadores de agresividad. A. Microfotografías representativas y análisis de la expresión de YY1 (factor de transcripción Yin Yang 1) (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). **B.** Inmuntinción de COX-2 (ciclooxigenasa 2), * $p < 0.05$. **C.** Inmuntinción de TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) (* $p < 0.05$) en los grupos de ratones alimentados con dieta control, dieta balanceada y dieta rica en ω -6. En la parte izquierda se observan microfotografías representativas de la expresión de los diferentes marcadores. En la parte derecha se aprecia la cuantificación de las tinciones, los datos representan las medias \pm SEM, $n=5$. Barra de escala: 20 μ m

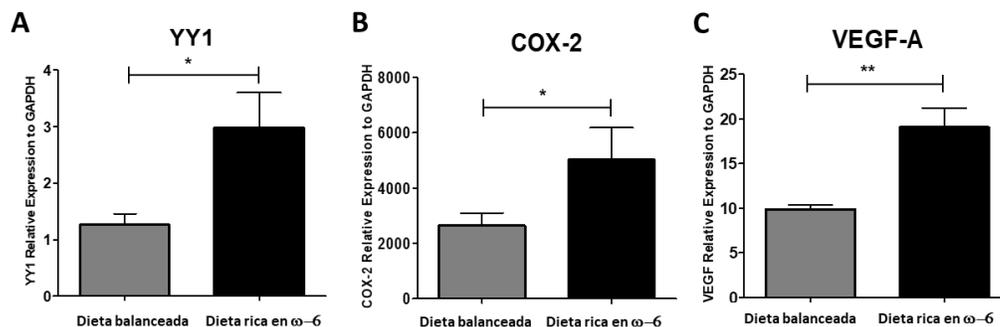


Figura 11. La alta ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 induce la expresión del ARNm de marcadores de agresividad. Análisis del ARNm de **A.** YY1, **B.** COX-2 y **C.** VEGF-A en los grupos de ratones alimentados con dieta balanceada y dieta rica en ω -6. Los datos representan las medias \pm SEM, $n=5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

7.7 Un alto consumo de PUFA de tipo ω -6 induce la localización nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B

Para poder entender el mecanismo a través del cual los PUFA de ω -6 están aumentando la expresión y activación de YY1 evaluamos la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B. Pues diversos estudios señalan que los PUFA derivados de ω -6 así como sus metabolitos activan la vía de NF- κ B [17], el cual a su vez puede activar transcripcionalmente a YY1 [18]. De forma importante encontramos que el grupo de animales que recibió una dieta rica en ω -6 presenta un incremento en la expresión nuclear de p65 en las células tumorales en comparación con el grupo de dieta control y dieta balanceada (* p <0.05) (Figura 12). Estos hallazgos sugieren fuertemente que la vía de NF- κ B se está activando cuando hay una alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 activando sus genes blancos entre ellos YY1, potenciando el fenotipo de agresividad.

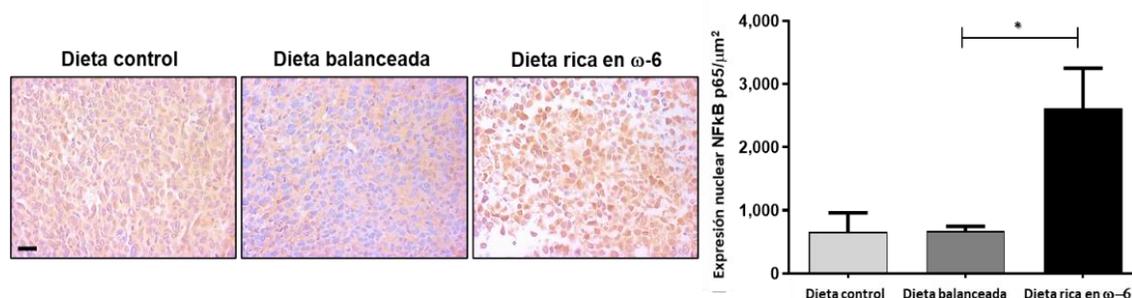


Figura 12. La alta ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 induce la expresión nuclear de la subunidad p65 de NFκB. Análisis de la expresión de la subunidad de p65 de NF- κ B. Grupos: dieta control, dieta balanceada y dieta rica en ω -6. En la parte izquierda se presentan microfotografías representativas de la expresión de la subunidad p65 de NFκB. En la parte derecha se aprecia la cuantificación de las tinciones, los datos representan las medias \pm SEM, $n=5$, * p <0.05. Barra de escala: 20 μ m.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los efectos de la dieta en los mecanismos que regulan los procesos oncológicos son muy amplios, y es claro que la dieta juega un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad, como lo demuestra la observación de que el 30-40 % de todos los tipos de cáncer pueden prevenirse con dietas adecuadas [76]. El papel adverso de una alta ingesta en PUFA de tipo ω -6 en la epidemiología del cáncer y su pronóstico se han evaluado ampliamente en estudios clínicos y en animales [77]. En este sentido, en varios estudios se ha demostrado que la alta ingesta de PUFA de tipo ω -6, como ARA y LA, que

son constituyentes comunes de la dieta occidental, se asocia con la progresión del cáncer [26]. Por el contrario, los PUFA de tipo ω -3, como ALA, EPA y DHA, generalmente se correlacionan con la protección contra el cáncer [77]. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que TCDD, un ligando prototípico de AHR, afecta el crecimiento y la metástasis de tumores pulmonares de manera positiva o negativa, según las concentraciones de PUFA ω -3 y ω -6 en la dieta. Este estudio reveló un mecanismo novedoso por el cual la activación del AHR, así como las enzimas CYP1, pueden afectar la progresión del cáncer a través de la acumulación de oxilipinas, particularmente epóxidos, lo que confirma los beneficios de una dieta equilibrada en PUFA y el riesgo de una dieta alta en PUFA de tipo ω -6 para promover el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo de cáncer de pulmón [52]. Sin embargo, hasta ahora, no se ha evaluado el papel en la agresividad tumoral después de la ingesta de una dieta rica en PUFA de tipo ω -6.

En este estudio, demostramos por primera vez que la dieta rica en ω -6, en comparación con la dieta control o la dieta balanceada, induce en el tumor derivado de células de carcinoma de Lewis una desdiferenciación sarcomatoide, esta diferenciación actualmente se cree que representa la transformación a una malignidad de un alto grado, caracterizado microscópicamente por células con una apariencia histológica fusiforme, con evidencia de desdiferenciación epitelial y mesenquimatosa. Los tumores con este aspecto histológico se han denominado carcinoma metaplásico [78]. Estos hallazgos son interesantes si consideramos que el cáncer sarcomatoide de pulmón es un tipo histológico raro y poco diferenciado de NSCLC, con un componente de diferenciación sarcomatoide, esta variante histológica se asocia con un peor pronóstico [79]. Martin y col., presentaron que la supervivencia a 5 años para los pacientes con cáncer sarcomatoide de pulmón fue del 24,5% en comparación con el 46,3% de los pacientes con NSCLC; además, la mediana del tiempo de recurrencia fue de 11,3 meses para los pacientes con cáncer sarcomatoide de pulmón y de 61,4 meses para los pacientes con NSCLC [80]. Además, se ha descrito que los pacientes con carcinoma sarcomatoide que presentaron metástasis responden mal a la quimioterapia convencional [81], [82] y presentan quimiorresistencia [83].

Como mencionamos, recientemente demostramos que el TCDD, un ligando prototípico del AHR, afecta el crecimiento y las metástasis pulmonares de manera positiva o negativa, dependiendo de las concentraciones de PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en la dieta [52].

En este modelo no encontramos diferencias en los grupos control de ratones (que no recibieron TCDD) en el crecimiento tumoral entre el grupo de ratones que recibió la dieta balanceada contra el grupo que fue alimentado con una dieta rica en PUFA de ω -6. Esto sería contradictorio con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, en ese estudio previo solo permitimos que los tumores alcanzaran un tamaño no mayor a 2000 cm³ y no evaluamos los cambios histopatológicos en este momento, ya que no era el objetivo de ese estudio. En cambio, en el presente estudio, los tumores se extirparon cuando alcanzaron un tamaño de al menos 3000 cm³. Esto sugiere que los cambios histopatológicos que denotan un fenotipo agresivo en los ratones que recibieron una dieta rica en ω -6, requieren de un mayor tiempo para que el desarrollo tumoral se manifieste claramente.

Por otro lado, la tinción positiva para CK5/6 demuestra el origen epitelial de este carcinoma sarcomatoide [70], [84], [85]. Los resultados obtenidos en este estudio sobre la expresión de estas citoqueratinas apoyan el hecho de que se produce una desdiferenciación escamosa y una mayor agresividad provocada por la alta ingesta de PUFA de tipo ω -6. Además, también demostramos que tanto el índice mitótico como la expresión de MCM2 fueron más altos en el grupo de ratones que recibió una dieta rica en ω -6. Esos parámetros se utilizan ampliamente como marcadores de proliferación neoplásica, los tumores que sobreexpresan la proteína MCM2, se asocian con un grado y estadio avanzado del tumor y un mal pronóstico [86]–[89]. Por lo tanto, la desdiferenciación de las células neoplásicas y el alto índice de proliferación celular en los tumores de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 respaldan el cambio de un fenotipo más agresivo.

Existen diversos estudios que señalan que la inhibición de la apoptosis conduce a la promoción del cáncer [90]. Varios estudios han demostrado el papel de los PUFA en el proceso apoptótico, se ha presentado evidencia que atribuye un papel pro-apoptótico a los PUFA tipo ω -3, mientras que los PUFA tipo ω -6 presentan evidencia contradictoria porque mientras algunos autores han indicado su papel en la inducción de muerte celular otros han señalado lo contrario [72]. Siendo más extensa la evidencia de la acción pro-apoptótica en los PUFA de tipo ω -3 que modifican la expresión de moléculas clave que juegan un papel central en la inducción de la apoptosis [91], [92]. En este estudio demostramos la participación de los PUFA de tipo ω -3 y ω -6 en los mecanismos de apoptosis en nuestro modelo de cáncer de pulmón. Curiosamente, encontramos que el

consumo de una dieta equilibrada en PUFA puede activar el proceso apoptótico dependiente de las caspasas 3, 8 y 9. Varios estudios respaldan el papel de los PUFA ω -3 en la activación de la vía extrínseca de la apoptosis en células de leucemia promielocítica (HL-60) [93], así como en células de cáncer de mama (ER+MCF-7) [94], en ambos estudios se observó un incremento de caspasa 8. Otros estudios además apoyan la activación de la vía intrínseca [92]. Incluso Ryadi y col., demostraron un “crosstalk” entre ambas vías mediado por el tratamiento con C20E (un análogo de EPA) en células humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231). C20E a través de TNFR1 causa la activación de la vía de señalización ASK1-MKK4/JNK/p38MAPK promoviendo la ruptura de Bid (tBid), conduciendo a MOMP y a la activación de la vía mitocondrial [95][96]. Por el lado contrario, fue muy sorprendente para nosotros encontrar que pese a los estudios hechos por otros autores en los que señalan un efecto inductor de la apoptosis tanto por vía intrínseca [97]–[99] como extrínseca [100] de los PUFA de tipo ω -6 (ARA, LA y GLA), nosotros encontramos un nivel muy bajo de expresión de las caspasas 9, 8 y 3 activas, pese a la alta concentración en PUFA de tipo ω -6 (ω -6/ ω -3 20:1) que contiene esta dieta. Esta nula activación de la vía apoptótica puede explicar porque los ratones de este grupo presentan un rápido crecimiento, así como mayor agresividad. Por otro lado, estos resultados van de acuerdo con estudios que apoyan el papel inhibitorio de la apoptosis por parte de ARA [101], [102]. Así como de sus metabolitos derivados (PGE₂, PGE₄ 12-HETE, 14-HETE, etc) [103]. Cabe mencionar que además ARA y LA pueden activar vías de supervivencia y proliferación [104], lo que puede estar evitando la activación de la apoptosis en este modelo murino. Además, nuestros resultados revelaron que los tumores de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaban niveles elevados de VEGF-A y CD31, lo que contribuía a la agresividad del tumor. Sin embargo, para conocer las rutas detalladas es necesario realizar más experimentos.

Se ha demostrado que la inflamación crónica se encuentra entre los factores más importantes que conducen a la carcinogénesis. La obesidad, la enfermedad inflamatoria intestinal, la colitis crónica y la pancreatitis son algunos ejemplos específicos de afecciones inflamatorias que son factores de riesgo conocidos para el cáncer con mecanismos compartidos que involucran niveles alterados de oxilipinas [105], [106]. Las oxilipinas son productos de oxidación de PUFA formados a través de una o más reacciones dependientes de mono o dioxígeno y son los principales mediadores de los efectos de los PUFA en el cuerpo. En este estudio evaluamos mediante un análisis de HPLC-MS los niveles de oxilipinas, con el fin de demostrar qué oxilipinas están

involucradas en el cambio de fenotipo de agresividad después de un alto consumo de PUFA de tipo ω -6. Los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaron un aumento significativo de varias oxilipinas derivadas del ARA en comparación con los ratones alimentados con una dieta balanceada, especialmente aquellos en los que está involucrada la vía COX (TXB₂ y PGD₂). Mientras que los ratones alimentados con dieta balanceada presentaron un aumento de PGD₃. En varios estudios se ha demostrado que las prostaglandinas de serie 2, principalmente PGE₂, actúa como un potente mediador de la inflamación y la proliferación celular [107], así como de la angiogénesis y la invasión [108], incluso en NSCLC estimula el crecimiento y la progresión de las células tumorales [109]. Por el contrario, la PGE₃ inhibió la proliferación en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 [110]. Además, los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaron altos niveles de oxilipinas ARA derivadas de la vía LOX, incluidas LXA₄, 12-oxo-EETE, HETEs y DIHETrEs. En particular, los HETE participan en los procesos de angiogénesis, proliferación y metástasis [111]. Incluso Liu y col., encontraron niveles elevados de 15-HETE en pacientes con NSCLC en comparación con los controles y proponen a estas oxilipinas como un posible marcador [112]. Además, los ratones alimentados con una dieta balanceada presentaron niveles elevados de HEPE, Vang y col., demostraron que el 15-HEPE inhibe el crecimiento celular y el metabolismo del ARA en células de adenocarcinoma prostático humano [113]. Estos estudios respaldan nuestro hallazgo que demostró un aumento en la proliferación y la angiogénesis en ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 en comparación con una dieta balanceada y dieta control. Además, en ratones alimentados con la dieta rica en ω -6 encontramos niveles elevados de oxilipinas derivadas del LA, que incluyen EpOMEs y DiHOMEs, aunque no fueron significativos, es importante señalar que estas oxilipinas participan en procesos inflamatorios, permeabilidad vascular, quimiotaxis de neutrófilos y tienen efectos citotóxicos en el avance de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas [114]. Incluso, McReynolds y col., describieron que los pacientes con COVID-19 grave que presentan evidencia de hiperinflamación, también presentaron niveles altos de 9,10- y 12,13-DiHOME en comparación con los controles sanos [115]. Además, los ratones alimentados con una dieta balanceada presentaron niveles más altos de oxilipinas derivadas de la vía CYP450, encontramos un aumento en los epóxidos derivados de EPA (EpETEs). Varios estudios han demostrado la participación del 17,18-EpETE en la disminución de la proliferación celular en las células endoteliales de cerebro mediante la inhibición del eje Ciclina D1/p38/MAPK [116] y las células de cáncer de mama MDA-MB-231 mediante la

producción deficiente de ATP y la caspasa-3 activa, así como la activación de la señalización de JNK, lo que conduce a la inhibición de la ciclina D1 y la detención del ciclo celular en la fase G1 [95]. Además, encontramos niveles altos de epóxidos de DHA (EpDPE) en los animales que recibieron la dieta balanceada. Algunos estudios han presentado que el 19,20-EpDPE disminuyó el crecimiento tumoral en un modelo murino de cáncer de mama [117] y redujo la angiogénesis al inhibir la expresión de VEGF-A y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) en las células endoteliales de cordón umbilical [118]. Además, 16,17-EpDPE y 19,20-EpDPE en combinación con t-AUCB disminuyen la metástasis de las células LLC en un modelo murino de angiogénesis [118]–[120]. Finalmente, Xia y col., demostraron que los metabolitos tipo epóxido derivados de PUFA de tipo ω -3 reducen la densidad de microvasos (DMV) (expresión de CD34) en el carcinoma de páncreas [121]. Estos estudios respaldan nuestros resultados y podrían explicar en parte por qué los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 tienen un fenotipo más agresivo.

Para dar soporte a nuestros hallazgos, con respecto al cambio en el fenotipo de agresividad después de la ingesta de una dieta rica en PUFA de tipo ω -6, analizamos varios marcadores involucrados en un fenotipo de agresividad. Curiosamente, en comparación con los ratones alimentados con una dieta de control o una dieta balanceada, los tumores de los animales alimentados con una dieta rica en ω -6 presentaron una alta expresión del factor de transcripción YY1. Esta observación es relevante, considerando que la sobreexpresión de YY1 se observa en muchos tipos de cáncer y sus niveles se correlacionan en gran medida con la progresión del cáncer, la metástasis, la resistencia a los medicamentos y el mal pronóstico [122]. Significativamente, YY1 puede regular transcripcionalmente a COX-2 [123] y la sobreexpresión del gen COX-2 está relacionada con la patogénesis de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón [124]. Curiosamente, también detectamos en los tumores de ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 una mayor expresión de COX-2, lo que también podría explicar en parte el aumento de las oxilipinas derivadas de esta vía en este grupo de ratones. Además, COX-2 contribuye a la regulación de varios genes implicados en la angiogénesis, incluido VEGF-A [125], como lo demostraron Marrogi y col., en pacientes con NSCLC a través de la correlación positiva entre los niveles de expresión de la proteína COX-2, VEGF-A y DMV. Además, el estadio clínico tumoral tanto de los carcinomas escamosos y no escamosos se asoció con los niveles de DMV [126]. Asimismo, Wu y col., presentaron que la sobreexpresión tanto de COX-2 como de

mPGES-1 afecta negativamente la supervivencia postoperatoria general y libre de enfermedad en pacientes con NSCLC [127]. Finalmente, Giaginis y col., demostraron que la alta expresión de la proteína COX-2 se asoció significativamente con la presencia de invasión linfovascular y aumento de la capacidad proliferativa tumoral en pacientes con NSCLC [128]. De hecho, nuestros resultados de la expresión de angiogénesis de COX-2 y VEGF-A en ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 en comparación con la dieta balanceada y control son consistentes con esa observación. Equivalentemente, se ha demostrado que YY1 induce el fenotipo TEM a través de la regulación de TGF- β en células tumorales de pulmón [129]. Igualmente, TGF- β puede regular transcripcionalmente a COX-2 [130]. Se ha encontrado que TGF- β en células sanas y células cancerosas en estadios tempranos tiene funciones supresoras de tumores, incluida la detención del ciclo celular y la apoptosis, pero en estadios tardíos puede promover la metástasis y la quimiorresistencia [131]. Nuestros resultados demostraron que el tumor de los ratones alimentados con una dieta rica en ω -6 en comparación con la dieta control o dieta balanceada, presentan una sobreexpresión de TGF- β . La participación de TGF- β podría ser parte de un sistema de retroalimentación en nuestro modelo que respalda el fenotipo de agresividad en ratones alimentados con una dieta rica en ω -6. Este resultado demostró por primera vez que una alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 aumenta la expresión y activación de YY1, potenciando el fenotipo de agresividad en este grupo de animales. Un posible mecanismo por el cual estos mediadores lipídicos podrían activar la expresión de YY1 sería a través de una vía indirecta mediada por la subunidad p65 de NF- κ B, que regula transcripcionalmente a YY1. Varios estudios han demostrado que la PGE₂, cuando se une a su receptor EP2, puede activar la vía de NF- κ B, tanto en un modelo de células de cáncer de ovario (SKOV3 y OVCAR3) [132], como en un modelo murino con aneurisma intracraneal [133]. Del mismo modo, presentamos por primera vez que el alto consumo de PUFA de tipo ω -6 provoca la translocación de la subunidad p65 de NF- κ B al núcleo, activando sus genes diana, incluido YY1, potenciando el fenotipo de agresividad. Esa evidencia respalda nuestro hallazgo y permite sugerir fuertemente que una alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 conduce a un fenotipo más agresivo de cáncer de pulmón mediado por oxilipinas pro-tumorales y una alta expresión de VEGF-A, CD31, YY1, COX-2 y TGF- β .

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, en el presente estudio demostramos por primera vez que la alta ingesta de PUFA de tipo ω -6 en la dieta induce un cambio de fenotipo de mayor agresividad de las células tumorales en comparación con animales alimentados con una dieta balanceada o con dieta control. Diversas actividades biológicas celulares y señales moleculares denotaron este aumento de la agresividad tumoral, como cambios histológicos en la dediferenciación tumoral, aumento de la proliferación celular, aumento de la angiogénesis, aumento de las oxilipinas (PGs, HETEs, HODEs, etc.) que median procesos pro-tumorales. Así como la expresión nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B que se correlaciona con un aumento en la expresión y activación de YY1 que promueve la transcripción de COX-2 y TGF- β , promoviendo finalmente un fenotipo de mayor agresividad tumoral. Mientras que una dieta equilibrada induce apoptosis dependiente de Caspasa 8, 9 y 3, lo que podría explicar en parte por qué este grupo de ratones presenta una agresividad moderada. La participación de todos estos componentes podría ser parte de un sistema de retroalimentación complejo en nuestro modelo que respalda el fenotipo de agresividad en ratones alimentados con una dieta rica en PUFA de tipo ω -6 (**Figura 13**).

Estos hallazgos pueden contribuir a proponer nuevas modalidades terapéuticas basadas en la dieta de PUFA, que probablemente mejoren el tratamiento y el manejo clínico del cáncer de pulmón agresivo, lo que apoya la importancia de la ingesta de una dieta equilibrada en PUFA ω -3/ ω -6.

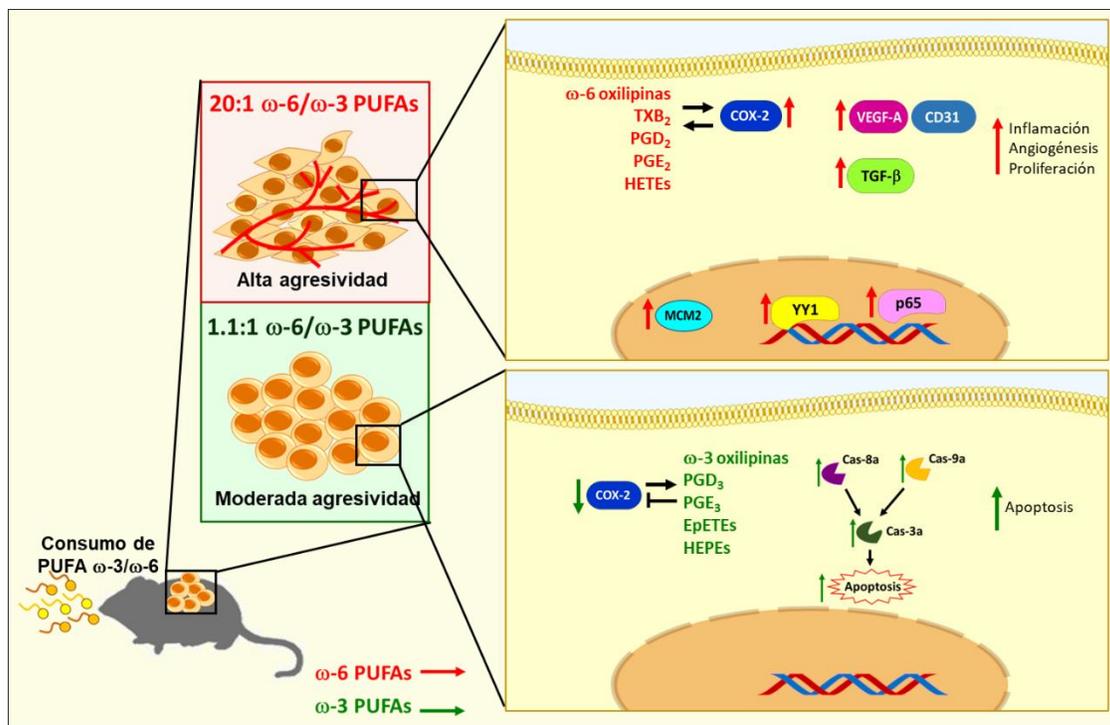


Figura 13. Modelo del efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de tipo omega 6 y omega 3 en la agresividad tumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón. Nuestro estudio propone que la alta ingesta de ω -6 (omega 6) en la dieta aumenta la agresividad de las células tumorales en comparación con los animales alimentados con una dieta balanceada o dieta control. Esto se vio reflejado en los cambios histológicos, en la desdiferenciación tumoral, aumento de la proliferación celular y aumento de la angiogénesis. Así como la expresión nuclear de la subunidad p65 de NF κ B (del inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) que se correlaciona con un aumento en la expresión y activación de YY1 (factor de transcripción Yin Yang 1) que promueve la transcripción de COX-2 (ciclooxigenasa 2) y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta). Por el lado contrario, una dieta equilibrada induce apoptosis dependiente de Caspasa 3, 8 y 9, lo que podría explicar en parte por qué este grupo de ratones presenta una agresividad moderada.

10. PRODUCTOS OBTENIDOS

10.1 Artículos publicados

- I. Sara Huerta-Yepez, Ana Tirado-Rodriguez, **Mayra R. Montecillo-Aguado**, Jun Yang, Bruce D. Hammock & Oliver Hankinson. **Aryl Hydrocarbon Receptor Dependent inductions of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism act inversely on tumor progression.** *Sci Rep.* 2020 May 12;10(1):7843. doi: 10.1038/s41598-020-64146-6. PMID: 32398692.
- II. Belen Tirado-Rodriguez, **Mayra Montecillo-Aguado**, Mario Morales-Martinez and Sara Huerta-Yepez. **Effect of Allergic Immune Response in the Modulation of**

Cancer Progression: Pivotal Role of the HIF1 α /Th17. *Journal of Allergy & Therapy.* May 2020.

- III. **Mayra Montecillo-Aguado**, Belen Tirado-Rodriguez, Zhen Tong, Owen M. Vega, Mario Morales-Martínez, Shaheen Abkenari, José Pedraza-Chaverri and Sara Huerta-Yepez. **Importance of the Role of ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Progression of Brain Cancer.** *Brain Sci.* 2020 Jun 17;10(6):381. doi: 10.3390/brainsci10060381. PMID: 32560280.

- IV. **Mayra Montecillo-Aguado**, Mario Morales-Martínez, Sara Huerta-Yepez & Mario I. Vega. **KLF4 inhibition by Kenpaullone induces cytotoxicity and chemo sensitization in B-NHL cell lines via YY1 independent.** *Leuk Lymphoma.* 2021 Jan 7;1-12. doi: 10.1080/10428194.2020.1869960. PMID: 33410342.

- V. Peña-Mercado Eduardo, García-Lorenzana Mario, Patiño-Morales Carlos Cesar, **Montecillo-Aguado Mayra**, Huerta-Yepez Sara and Beltran Nohra E. **Bioelectric, tissue, and molecular characteristics of the gastric mucosa at different times of ischemia.** 2021 Sep;246(18):1968-1980. doi: 10.1177/15353702211021601. PMID: 34130514.

- VI. Galan-Salinas, G. Corral-Ruíz, M.J. Perez-Vega, L. Fabila-Castillo, R. Silva-García, B. Marquina-Castillo, J.C. Leon-Contreras, J. Barrios-Payan, A. Francisco-Cruz, **M. Montecillo-Aguado**, S. Huerta-Yepez, J. Calderon-Amador, L. Flores-Romo, R. Hernández-Pando, L.E. Sanchez-Torres. **Monocyte Locomotion Inhibitory Factor confers neuroprotection and prevents the development of murine cerebral malaria.** *Int Immunopharmacol.* 2021 Aug; 97:107674. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107674. Epub 2021 May 25. PMID: 3404418.

- VII. Héctor I. Saldivar-Cerón, Olga Villamar-Cruz, Claire M. Wells, Ibrahim Oguz, Federica Spaggiari, Jonathan Chernoff, Genaro Patiño-López, Sara Huerta-Yepez, **Mayra Montecillo-Aguado**, Clara M. Rivera-Pazos, Marco A. Loza-Mejía, Alonso Vivar-Sierra, Paola Briseño-Díaz, Alejandro Zentella-Dehesa, Alfonso Leon-Del-Rio, Alejandro López-Saavedra, Laura Padierna-Mota, María de Jesús Ibarra-Sánchez, José Esparza-López, Rosaura Hernández-Rivas and Luis E. Arias-Romero. **p21-Activated Kinase 1 Promotes Breast Tumorigenesis via Phosphorylation and Activation of the Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II.** *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022 January 17. 9:759259. doi: 10.3389/fcell.2021.759259. PMID: 35111748.

- VIII. **Mayra Montecillo-Aguado**, Belen Tirado-Rodriguez, Gabriela Antonio-Andres, Mario Morales-Martinez, Zhen Tong, Jun Yang, Bruce D. Hammock, Rogelio Hernandez-Pando and Sara Huerta-Yepez. **Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids Enhance Tumor Aggressiveness in Experimental Lung Cancer Model: Important Role of Oxylipins.** *Int J Mol Sci.* 2022 May 31;23(11):6179. doi: 10.3390/ijms23116179. PMID: 35682855.

10.2 Artículos en revisión

Mayra Montecillo-Aguado, Belen Tirado-Rodriguez, and Sara Huerta-Yepe. **Participation of polyunsaturated fatty acids in apoptosis: implications for cancer.** Int J Mol Sci.

10.3 Congresos

- I. **Mayra R. Montecillo Aguado**. 12va Reunión de Investigación Pediátrica y 9na Reunión de Investigación en Enfermería Pediátrica. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 10-12 de octubre, 2018.
- II. Gabriela Antonio-Andrés, Mario Morales Martínez, Belén Tirado Rodríguez, **Mayra Montecillo Aguado**, Enrique Juárez Villegas, Elva Jiménez Hernández, Sara Huerta Yepe. **“Evaluación del eje PTEN/AKT/NFKB en la expresión de HIF-1 y YY1 y su papel en la quimio resistencia mediada por GP-170 en la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica”**. 13va Reunión de Investigación Pediátrica y 10ma Reunión de Investigación en Enfermería Pediátrica. Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mex. 2-4 de octubre, 2019.
- III. Peña-Mercado Eduardo, Hernández-Cueto Daniel, Huerta-Yepe Sara, **Montecillo-Aguado Mayra**, García-Lorenzana Mario y Beltrán-Vargas Nohra E. **“USO DE MICROARREGLOS TISULARES EN INGENIERIA DE TEJIDO CARDIACO”**, XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología”. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 9-13 de noviembre 2020.
- IV. Peña-Mercado Eduardo, Cruz-Ledesma Anahis, **Montecillo-Aguado Mayra**, García-Lorenzana Mario, Huerta-Yepe Sara y Beltrán-Vargas Nohra E. **“EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN UN MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN GÁSTRICA. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO”**, “XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología”. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 9-13 de noviembre 2020.
- V. Berenice Alcalá Mota Velazco; Sara Huerta Yepe; Anel Gómez García; Lina Urania Hernández Román; Verónica Gómez Ruiz; Ernesto A. Parada Sandoval; Sandra Guadalupe Sánchez Ceja; **Mayra Montecillo Aguado**; Clara M. Rivera Pasos; Daniel Hernández Cueto. **EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) Y BCL-XL EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**. 16vo Congreso Nacional de ciencia, Tecnología e Innovación y 10mo Encuentro de jóvenes Investigadores del estado de Michoacán. Morelia, Michoacán, 22 de octubre 2021.
- VI. **Mayra Montecillo-Aguado**, Belén Tirado-Rodriguez, Gabriela Antonio-Andres, Mario Morales-Martinez, Zhen Tong, Bruce D. Hammock, Rogelio Hernandez-Pando, Oliver Hankinson y Sara Huerta-Yepe. **“Los ácidos grasos poliinsaturados de omega-6 inducen un fenotipo de mayor agresividad tumoral en un modelo de cáncer de pulmón”**, XXV Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaria de Salud. Acapulco, Gro. 3-5 de noviembre 2021.

- VII. **Mayra Montecillo-Aguado**, Belén Tirado-Rodríguez, Gabriela Antonio-Andrés, Mario Morales-Martínez, Zhen Tong, Bruce D. Hammock, Rogelio Hernández-Pando, Oliver Hankinson y Sara Huerta-Yepez. “**Los ácidos grasos poliinsaturados de omega-6 inducen un fenotipo de mayor agresividad tumoral en un modelo de cáncer de pulmón**”, Reunión anual de investigación. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 11-12 de agosto, 2022.
- VIII. **Mayra R. Montecillo Aguado**. 14va Reunión de Investigación Pediátrica y 11va Reunión de Investigación en Enfermería Pediátrica. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex.5, 6 y 7 de octubre, 2022.

10.4 Capítulos de libro

- I. Tania V. Lopez-Perez, Belén Tirado-Rodríguez Mario Morales Martínez, **Mayra Montecillo-Aguado**, Sara Huerta-Yepez. Capítulo 15: YY1 regulation of tumor cell resistance to both chemo and immunotherapeutic drugs. Libro: YY1 in the Control of the Pathogenesis and Drug Resistance of Cancer: a critical Therapeutic Target. Editor: Benjamin Bonavida. Editorial: Elsevier, 2020. ISBN B978-0-12-821909-6.00010-9, 00010.

10.5 Cursos impartidos

- I. **PROFESOR INVITADO:** Introducción y fundamentos de la técnica de inmunohistoquímica convencional y automatizada. 3er. Curso avanzado de tecnología de microarreglos de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores en cáncer: aplicación en investigación y asistencia. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 17 de junio al 19 de agosto 2020.
- II. **PROFESOR INVITADO:** Introducción y fundamentos de la técnica de inmunohistoquímica convencional y automatizada. Curso en línea de la utilidad de la tecnología de microarreglo de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores en cáncer: Aplicación en investigación y asistencia. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 16 de junio al 18 de agosto 2021.
- III. **PROFESOR INVITADO:** Introducción y fundamentos de la técnica de inmunohistoquímica. 4to. Curso teórico-práctico de tecnología de microarreglos de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores en cáncer: aplicación en investigación y asistencia. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 21 al 23 de septiembre 2022.
- IV. **PROFESOR INVITADO:** Realización de inmunohistoquímica. 4to. Curso teórico-práctico de tecnología de microarreglos de tejidos y patología digital para la búsqueda de biomarcadores en cáncer: aplicación en investigación y asistencia.

Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 21 al 23 de septiembre 2022.

- V. **PROFESOR ORGANIZADOR:** Diseño de experimentos con ratones genéticamente modificados. 1er. Curso teórico-práctico de modelos murinos para el estudio de la progresión y metástasis tumoral. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 7 al 11 de noviembre 2022.
- VI. **PROFESOR ORGANIZADOR:** Evaluación de la expresión de biomarcadores mediante patología digital. 1er. Curso teórico-práctico de modelos murinos para el estudio de la progresión y metástasis tumoral. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México. 7 al 11 de noviembre 2022.

10.6 Divulgación científica

- I. **Organizador:** “Día de puertas abiertas a la ciencia”, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 28 y 29 de junio 2018.
- II. **Organizador:** “Chiquitunel de la ciencia”, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 30 de abril 2019.
- III. **Organizador:** “2do. Día de puertas abiertas a la ciencia”, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 16-18 de octubre 2019.
- IV. **Organizador:** “2do. Chiquitunel de la ciencia”, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, Mex. 29 de abril 2022.

11. AGRADECIMIENTOS

Unidad de investigación en Enfermedades Hemato Oncológicas. Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Sara Huerta Yépez

Dra. Ana Belén Tirado Rodríguez

M. en C. Gabriela Antonio Andrés

Biol. Daniel Hernández Cueto

Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica

Dr. Mario Morales Martínez

Department of Pathology & Laboratory Medicine, University of California, Los Angeles, USA

PhD. Oliver Hankinson

Molecular Toxicology Interdepartmental Program and Environmental Health Sciences, University of California, Los Angeles, USA

Ms. Zhen Tong

Department of Entomology and Nematology, Comprehensive Cancer Center University of California, Davis, USA

PhD. Bruce D. Hammock

PhD. Jun Yang

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCNSZ), Departamento de patología Experimental

Dr. Rogelio Hernández Pando

Bioterio. Hospital Infantil de México Federico Gómez

MVZ. Raúl Castro Luna

M. en C. Leonel Martínez Cristóbal

Este trabajo fue realizando gracias a la beca otorgada por CONACyT, México. Mayra Remedios Montecillo Aguado fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (M. M-A. 425888/592671).

12. FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizando gracias a la beca otorgada por CONACyT, México. Mayra Remedios Montecillo Aguado fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (M. M-A. 425888/592671).

Este trabajo recibió apoyo por parte del Fondo Federal de Investigación en Salud del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM/2017/014).

13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] "Lung Source: Globocan 2020 Number of new cases in 2020, both sexes, all ages," 2020.
- [2] "Cancer Statistics Review, 1975-2016 - SEER Statistics." [Online]. Available: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2016/. [Accessed: 01-May-2020].
- [3] INEGI, "Comunicado De Prensa Núm. 105/ Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer (4 De Febrero)," *Inegi*, no. 2018, pp. 1–11, 2021.
- [4] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [5] International Agency for Research on Cancer. Globocan., "All cancers incidence worldwide.," *Int. Agency Res. Cancer*, vol. 876, pp. 2018–2019, 2019.
- [6] J. Fujimoto and I. I. Wistuba, "Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma," *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 31, no. 4, pp. 306–313, 2014.
- [7] E. C. Ko, D. Raben, and S. C. Formenti, "The integration of radiotherapy with immunotherapy for the treatment of non-small cell lung cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 24, no. 23. American Association for Cancer Research Inc., pp. 5792–5806, 01-Dec-2018.
- [8] H. Lemjabbar-Alaoui, O. U. I. Hassan, Y. W. Yang, and P. Buchanan, "Lung cancer: Biology and treatment options," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1856, no. 2. Elsevier B.V., pp. 189–210, 01-Dec-2015.
- [9] S. Muñoz-Hernández *et al.*, "Association between nuclear expression of retinoic acid receptor alpha and beta and clinicopathological features and prognosis of advanced non-small cell lung cancer," *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 6, pp. 1051–1061, Dec. 2016.
- [10] W. C. Willett, "Diet and Cancer," *Oncologist*, vol. 5, no. 5, pp. 393–404, Oct. 2000.
- [11] O. M. Vega, S. Abkenari, Z. Tong, A. Tedman, and S. Huerta-Yepey, "Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Lung Cancer: nutrition or Pharmacology?," *Nutr. Cancer*, pp. 1–21, May 2020.
- [12] P. C. Calder, "Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health," *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, vol. 39, no. 1 Suppl. SAGE Publications Inc., pp. 18S-32S, 21-Sep-2015.
- [13] G. O. BURR and M. M. BURR., "A NEW DEFICIENCY DISEASE PRODUCED BY THE RIGID EXCLUSION OF FAT FROM THE DIET," *Nutr. Rev.*, vol. 31, no. 8, pp. 148–149, Apr. 2009.
- [14] A. A. Spector and H. Y. Kim, "Discovery of essential fatty acids," *J. Lipid Res.*, vol. 56, no. 1, pp. 11–21, 2015.
- [15] M. H. Moghadasian, "Advances in dietary enrichment with N-3 fatty acids," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 48, no. 5, pp. 402–410, 2008.
- [16] D. E. Kim, X. Shang, A. D. Assefa, Y. S. Keum, and R. K. Saini, "Metabolite profiling

of green, green/red, and red lettuce cultivars: Variation in health beneficial compounds and antioxidant potential," *Food Res. Int.*, vol. 105, no. October 2017, pp. 361–370, 2018.

- [17] J. Sontrop and M. K. Campbell, "ω-3 polyunsaturated fatty acids and depression: A review of the evidence and a methodological critique," *Preventive Medicine*, vol. 42, no. 1. pp. 4–13, Jan-2006.
- [18] G. Parker, N. A. Gibson, H. Brotchie, G. Heruc, A. M. Rees, and D. Hadzi-Pavlovic, "Omega-3 fatty acids and mood disorders," *American Journal of Psychiatry*, vol. 163, no. 6. American Psychiatric Association, pp. 969–978, 2006.
- [19] K. Buddhachat, P. Siengdee, S. Chomdej, K. Soontornvipart, and K. Nganvongpanit, "Effects of different omega-3 sources, fish oil, krill oil, and green-lipped mussel against cytokine-mediated canine cartilage degradation.," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 53, no. 5, pp. 448–457, May 2017.
- [20] W. L. Smith, Y. Urade, and P.-J. Jakobsson, "Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis," *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 10, pp. 5821–5865, Oct. 2011.
- [21] M. Sutherland, P. Shankaranarayanan, T. Schewe, and S. Nigam, "Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: Implications for its involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism," *Biochem. J.*, vol. 353, no. 1, pp. 91–100, Jan. 2001.
- [22] S. Feltenmark *et al.*, "Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 2, pp. 680–685, Jan. 2008.
- [23] U. N. Das, "Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology," *Biotechnology Journal*, vol. 1, no. 4. Biotechnol J, pp. 420–439, Apr-2006.
- [24] M. Montecillo-Aguado *et al.*, "Importance of the role of ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids in the progression of brain cancer," *Brain Sci.*, vol. 10, no. 6, pp. 1–18, 2020.
- [25] A. P. DeFilippis and L. S. Sperling, "Understanding omega-3's," *American Heart Journal*, vol. 151, no. 3. pp. 564–570, Mar-2006.
- [26] A. P. Simopoulos, "An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity," *Nutrients*, vol. 8, no. 3, pp. 1–17, 2016.
- [27] I. Ramírez-Silva, S. Villalpando, J. E. Moreno-Saracho, and D. Bernal-Medina, "Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006," *Nutr. Metab.*, vol. 8, no. 1, p. 33, 2011.
- [28] A. Sekikawa *et al.*, "Serum levels of marine-derived n-3 fatty acids in Icelanders, Japanese, Koreans, and Americans-A descriptive epidemiologic study," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 87, no. 1, pp. 11–16, Jul. 2012.
- [29] K. D. Stark, M. E. Van Elswyk, M. R. Higgins, C. A. Weatherford, and N. Salem, *Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults*, vol. 63. Elsevier B.V., 2016.

- [30] T. L. Blasbalg, J. R. Hibbeln, C. E. Ramsden, S. F. Majchrzak, and R. R. Rawlings, "Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 93, no. 5, pp. 950–962, 2011.
- [31] M. E. Bégin, U. N. Das, G. Ells, and D. F. Horrobin, "Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids," *Prostaglandins. Leukot. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 177–186, 1985.
- [32] A. Trombetta, M. Maggiora, G. Martinasso, P. Cotogni, R. A. Canuto, and G. Muzio, "Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 165, no. 3, pp. 239–250, Feb. 2007.
- [33] G. Muzio *et al.*, "4-Hydroxyhexenal and 4-hydroxynonenal are mediators of the anti-cachectic effect of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on human lung cancer cells," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 99, pp. 63–70, Oct. 2016.
- [34] A. Zajdel, A. Wilczok, and M. Tarkowski, "Toxic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in human lung A549 cells," *Toxicol. Vitro.*, vol. 30, no. 1, pp. 486–491, 2015.
- [35] Y. Yin, C. Sui, F. Meng, P. Ma, and Y. Jiang, "The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway," *Lipids in Health and Disease*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., 03-May-2017.
- [36] N. Kim *et al.*, "Docosahexaenoic acid induces cell death in human non-small cell lung cancer cells by repressing mTOR via AMPK activation and PI3K/Akt inhibition," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [37] S. Serini *et al.*, "Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression," *Apoptosis*, vol. 13, no. 9, pp. 1172–1183, Sep. 2008.
- [38] P. Yang *et al.*, "Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E(3) from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells," *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 6, pp. 1030–1039, Jun. 2004.
- [39] P. Yang *et al.*, "Anticancer activity of fish oils against human lung cancer is associated with changes in formation of PGE2 and PGE3 and alteration of Akt phosphorylation," *Mol. Carcinog.*, vol. 53, no. 7, pp. 566–577, 2014.
- [40] H. J. Lee, M. K. Park, E. J. Lee, and C. H. Lee, "Resolvin D1 inhibits TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transition of A549 lung cancer cells via lipoxin A4 receptor/formyl peptide receptor 2 and GPR32," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 12, pp. 2801–2807, 2013.
- [41] P. Yang *et al.*, "Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E3 from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells," *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 6, pp. 1030–1039, Jun. 2004.
- [42] H. Ling *et al.*, "Pachymic acid inhibits cell growth and modulates arachidonic acid metabolism in nonsmall cell lung cancer A549 cells," *Mol. Carcinog.*, vol. 49, no. 3, pp. 271–282, Mar. 2010.
- [43] S. H. Xia, J. Wang, and J. X. Kang, "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*, vol. 26, no. 4, pp. 779–784, 2005.

- [44] W. Yu *et al.*, “Cytochrome P450 ω -hydroxylase promotes angiogenesis and metastasis by upregulation of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 68, no. 3, pp. 619–629, Sep. 2011.
- [45] M. Mouradian, I. V. Ma, E. D. Vicente, K. D. Kikawa, and R. S. Pardini, “Docosahexaenoic Acid-mediated Inhibition of Heat Shock Protein 90-p23 Chaperone Complex and Downstream Client Proteins in Lung and Breast Cancer,” *Nutr. Cancer*, vol. 69, no. 1, pp. 92–104, Jan. 2017.
- [46] D. Panigrahy *et al.*, “Epoxyeicosanoids stimulate multiorgan metastasis and tumor dormancy escape in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 1, pp. 178–191, 2012.
- [47] Z. Guodong *et al.*, “Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis , tumor growth , and metastasis,” *Pnas*, vol. 110, no. 16, pp. 6530–6535, 2013.
- [48] P. Yang *et al.*, “Anticancer activity of fish oils against human lung cancer is associated with changes in formation of PGE2 and PGE3 and alteration of Akt phosphorylation,” *Mol. Carcinog.*, vol. 53, no. 7, pp. 566–577, 2014.
- [49] M. Mouradian, K. D. Kikawa, E. D. Johnson, K. L. Beck, and R. S. Pardini, “Key roles for GRB2-associated-binding protein 1, phosphatidylinositol-3-kinase, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2 and transforming growth factor alpha in linoleic acid-induced upregulation of lung and breast cancer cell growth,” *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 90, no. 4, pp. 105–115, 2014.
- [50] H. H. Lee, H. Kang, and H. Cho, “Natural killer cells and tumor metastasis,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 40, no. 9. Pharmaceutical Society of Korea, pp. 1037–1049, 01-Sep-2017.
- [51] J. Roy, J. E. Watson, I. S. Hong, T. M. Fan, and A. Das, “Antitumorigenic Properties of Omega-3 Endocannabinoid Epoxides,” *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 13, pp. 5569–5579, Jul. 2018.
- [52] S. Huerta-Yeppez, A. Tirado-Rodriguez, M. R. Montecillo-Aguado, J. Yang, B. D. Hammock, and O. Hankinson, “Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent inductions of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism act inversely on tumor progression,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020.
- [53] L. G. Wood, J. Attia, P. McElduff, M. McEvoy, and P. G. Gibson, “Assessment of dietary fat intake and innate immune activation as risk factors for impaired lung function,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, no. 8, pp. 818–825, Aug. 2010.
- [54] R. A. Murphy, M. Mourtzakis, Q. S. Chu, T. Reiman, and V. C. Mazurak, “Skeletal Muscle Depletion Is Associated with Reduced Plasma (n-3) Fatty Acids in Non-Small Cell Lung Cancer Patients,” *J. Nutr.*, vol. 140, no. 9, pp. 1602–1606, Sep. 2010.
- [55] J. M. L. Roodhart *et al.*, “Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids,” *Cancer Cell*, vol. 20, no. 3, pp. 370–383, Sep. 2011.

- [56] R. A. Murphy, M. Mourtzakis, Q. S. Chu, T. Reiman, and V. C. Mazurak, "Skeletal muscle depletion is associated with reduced plasma (n-3) fatty acids in non-small cell lung cancer patients," *J. Nutr.*, vol. 140, no. 9, pp. 1602–1606, Sep. 2010.
- [57] B. S. Van Der Meij *et al.*, "Oral nutritional supplements containing n-3 polyunsaturated fatty acids affect quality of life and functional status in lung cancer patients during multimodality treatment: an RCT," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 66, no. 3, pp. 399–404, Mar. 2012.
- [58] B. S. Van Der Meij *et al.*, "Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment," *J. Nutr.*, vol. 140, no. 10, pp. 1774–1780, Oct. 2010.
- [59] Y. Liao *et al.*, "Efficacy of omega-3 PUFAs in depression: A meta-analysis," *Transl. Psychiatry*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019.
- [60] G. Deacon, C. Kettle, D. Hayes, C. Dennis, and J. Tucci, "Omega 3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of depression," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 1, pp. 212–223, Jan. 2017.
- [61] C. Finocchiaro *et al.*, "Effect of n-3 fatty acids on patients with advanced lung cancer: a double-blind, placebo-controlled study," *Br. J. Nutr.*, vol. 108, no. 2, pp. 327–333, Jul. 2012.
- [62] K. Sánchez-Lara *et al.*, "Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial," *Clin. Nutr.*, vol. 33, no. 6, pp. 1017–1023, Dec. 2014.
- [63] J. Liu *et al.*, "Serum free fatty acid biomarkers of lung cancer," *Chest*, vol. 146, no. 3, pp. 670–679, 2014.
- [64] S. Huerta-Yeppez, A. Tirado-Rodriguez, M. R. Montecillo-Aguado, J. Yang, B. D. Hammock, and O. Hankinson, "Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent inductions of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism act inversely on tumor progression," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–17, 2020.
- [65] Sugiura, "Studies in a Tumor Spectrum III. The Effect of Phosphor amides on the Growth of a Variety of Mouse and Rat Tumors* KANEMATSU SUGIURA ANDC. CHESTER STOCK WITH THEASSISTANCE OF MITONOM," 1955.
- [66] J. Yang, K. Schmelzer, K. Georgi, and B. D. Hammock, "Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 19, pp. 8085–8093, Oct. 2009.
- [67] A. M. Zivkovic *et al.*, "Serum oxylipin profiles in IgA nephropathy patients reflect kidney functional alterations," *Metabolomics*, vol. 8, no. 6, pp. 1102–1113, Dec. 2012.
- [68] J. Yang, P. Solaimani, H. Dong, B. Hammock, and O. Hankinson, "Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin markedly increases the levels of a number of cytochrome P450 metabolites of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the liver and lung," *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 38, no. 6. *J Toxicol Sci*,

pp. 833–836, 2013.

- [69] J. S. Lewis, J. H. Ritter, and S. El-Mofty, “Alternative epithelial markers in sarcomatoid carcinomas of the head and neck, lung, and bladder-p63, MOC-31, and TTF-1,” *Mod. Pathol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1471–1481, 2005.
- [70] M. Antoine *et al.*, “Carcinomes sarcomatoïdes pulmonaires,” *Ann. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 44–54, 2016.
- [71] D. R. Lucas *et al.*, “Sarcomatoid mesothelioma and its histological mimics: A comparative immunohistochemical study,” *Histopathology*, vol. 42, no. 3, pp. 270–279, 2003.
- [72] S. Serini, E. Piccioni, N. Merendino, and G. Calviello, “Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: Implications for cancer,” *Apoptosis*, vol. 14, no. 2, pp. 135–152, 2009.
- [73] B. R. Nicholson S1, Whitehouse H, Naidoo K, “Yin Yang 1 in human cancer.,” *Crit Rev Oncog.*, vol. 16, no. 3–4, pp. 245–60, 2011.
- [74] G. Castellano *et al.*, “The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression,” *Cell Cycle*, vol. 8, no. 9, pp. 1367–1372, 2009.
- [75] T. Huang *et al.*, “Transcription Factor YY1 Modulates Lung Cancer Progression by Activating lncRNA-PVT1,” *DNA Cell Biol.*, vol. 36, no. 11, pp. 947–958, 2017.
- [76] M. S. Donaldson, “Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet,” *Nutrition Journal*, vol. 3. Nutr J, 20-Oct-2004.
- [77] S. Huerta-Yépez, A. B. Tirado-Rodriguez, and O. Hankinson, “Papel de las dietas ricas en omega-3 y omega-6 en el desarrollo del cáncer,” *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, vol. 73, no. 6, pp. 446–456, 2016.
- [78] M. R. Wick and P. E. Swanson, “Carcinosarcomas: current perspectives and an historical review of nosological concepts.,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 10, no. 2, pp. 118–127, May 1993.
- [79] A. Weissferdt, “Pulmonary sarcomatoid carcinomas: A review,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 25, no. 5, pp. 304–313, 2018.
- [80] L. W. Martin *et al.*, “Sarcomatoid Carcinoma of the Lung: A Predictor of Poor Prognosis,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 84, no. 3, pp. 973–980, 2007.
- [81] H. M. Bae *et al.*, “Palliative chemotherapy for pulmonary pleomorphic carcinoma,” *Lung Cancer*, vol. 58, no. 1, pp. 112–115, Oct. 2007.
- [82] J. E. Chaft *et al.*, “Clinical outcomes with perioperative chemotherapy in sarcomatoid carcinomas of the lung,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1400–1405, 2012.
- [83] F. Raveglia *et al.*, “Personal experience in surgical management of pulmonary pleomorphic carcinoma,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 78, no. 5, pp. 1742–1747, Nov. 2004.
- [84] J. S. Lewis, J. H. Ritter, and S. El-Mofty, “Alternative epithelial markers in sarcomatoid carcinomas of the head and neck, lung, and bladder-p63, MOC-31,

and TTF-1," *Mod. Pathol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1471–1481, Nov. 2005.

- [85] D. R. Lucas *et al.*, "Sarcomatoid mesothelioma and its histological mimics: a comparative immunohistochemical study," *Histopathology*, vol. 42, no. 3, pp. 270–279, Mar. 2003.
- [86] T. J. Dudderidge *et al.*, "Mcm2, geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 7, pp. 2510–2517, Apr. 2005.
- [87] J. J. Going, W. N. Keith, L. Neilson, K. Stoeber, R. C. Stuart, and G. H. Williams, "Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and barrett's mucosa," *Gut*, vol. 50, no. 3, pp. 373–377, 2002.
- [88] S. Abe *et al.*, "Targeting MCM2 function as a novel strategy for the treatment of highly malignant breast tumors," *Oncotarget*, vol. 6, no. 33, pp. 34892–34909, 2015.
- [89] G. Aihemaiti *et al.*, "Subcellular localization of MCM2 correlates with the prognosis of ovarian clear cell carcinoma," *Oncotarget*, vol. 9, no. 46, pp. 28213–28225, Jun. 2018.
- [90] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 04-Mar-2011.
- [91] B. Skendera, A. H. Vaculova, and J. Hofmanova, "Docosahexaenoic fatty acid (DHA) in the regulation of colon cell growth and cell death: A review," *Biomed. Pap.*, vol. 156, no. SUPPL. 3, pp. 186–199, 2012.
- [92] E. A. Song and H. Kim, "Docosahexaenoic acid induces oxidative DNA damage and apoptosis, and enhances the chemosensitivity of cancer cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 8, 2016.
- [93] K. Arita *et al.*, "Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 62, no. 7, pp. 821–828, Oct. 2001.
- [94] S. Roy *et al.*, "Alpha-linolenic acid stabilizes HIF-1 α and downregulates FASN to promote mitochondrial apoptosis for mammary gland chemoprevention," *Oncotarget*, vol. 8, no. 41, pp. 70049–70071, 2017.
- [95] H. R. E. Dyari, T. Rawling, K. Bourget, and M. Murray, "Synthetic ω -3 Epoxyfatty Acids As Antiproliferative and Pro-apoptotic Agents in Human Breast Cancer Cells," *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 17, pp. 7459–7464, 2014.
- [96] H. R. E. Dyari *et al.*, "A novel synthetic analogue of v-3 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid activates TNF receptor-1/ ASK1/JNK signaling to promote apoptosis in human breast cancer cells," *FASEB J.*, vol. 31, no. 12, pp. 5246–5257, 2017.
- [97] D. Dymkowska, J. Szczepanowska, M. R. Więckowski, and L. Wojtczak, "Short-term and long-term effects of fatty acids in rat hepatoma AS-30D cells: The way to apoptosis," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1763, no. 2, pp. 152–163, Feb. 2006.
- [98] D. Dymkowska and L. Wojtczak, "Arachidonic acid-induced apoptosis in rat hepatoma AS-30D cells is mediated by reactive oxygen species," *Acta Biochim.*

Pol., vol. 56, no. 4, pp. 711–715, 2009.

- [99] R. R. Vento, N. N. D'alessandro, M. M. Giuliano, M. M. Lauricella, M. M. Carabillò, and G. G. Tesoriere, "Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: Involvement of oxidative stress," *Exp. Eye Res.*, vol. 70, no. 4, pp. 503–517, 2000.
- [100] S. Polavarapu, B. S. Dwarakanath, and U. N. Das, "Arachidonic acid activates extrinsic apoptotic pathway to enhance tumoricidal action of bleomycin against IMR-32 cells," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 132, pp. 16–22, May 2018.
- [101] L. Cui *et al.*, "Chemotherapy induces ovarian cancer cell repopulation through the caspase 3-mediated arachidonic acid metabolic pathway," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 10, pp. 5817–5826, Dec. 2017.
- [102] J. Yang *et al.*, "Adipocytes promote ovarian cancer chemoresistance," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019.
- [103] A. M. Monjazeb, K. P. High, C. Koumenis, and F. H. Chilton, "Inhibitors of arachidonic acid metabolism act synergistically to signal apoptosis in neoplastic cells," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 73, no. 6, pp. 463–474, Dec. 2005.
- [104] D. Panigrahy, A. Kaipainen, E. R. Greene, and S. Huang, "Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 4, pp. 723–735, 2010.
- [105] J. Ávila-Román *et al.*, "Preventive effect of the microalga *Chlamydomonas debaryana* on the acute phase of experimental colitis in rats," *Br. J. Nutr.*, vol. 112, no. 7, pp. 1055–1064, Oct. 2014.
- [106] K. P. Liput *et al.*, "Effects of dietary n–3 and n–6 polyunsaturated fatty acids in inflammation and cancerogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 13, 2021.
- [107] P. C. Calder, "N-3 Fatty acids, inflammation and immunity: New mechanisms to explain old actions," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 72, no. 3, pp. 326–336, 2013.
- [108] K. Krysan, K. Reckamp, S. Sharma, and S. Dubinett, "The Potential and Rationale for COX-2 Inhibitors in Lung Cancer," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–220, May 2008.
- [109] X. Zhong *et al.*, "Novel link between prostaglandin E2 (PGE2) and cholinergic signaling in lung cancer: The role of c-Jun in PGE2-induced $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression and tumor cell proliferation," *Thorac. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 488–500, Jul. 2015.
- [110] P. Yang *et al.*, "Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E(3) from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells.," *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 6, pp. 1030–9, Jun. 2004.
- [111] J. J. Moreno, "New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2009.
- [112] J. Liu *et al.*, "Serum free fatty acid biomarkers of lung cancer," *Chest*, vol. 146, no. 3, pp. 670–679, Sep. 2014.

- [113] K. Vang and V. A. Ziboh, "15-Lipoxygenase metabolites of γ -linolenic acid/eicosapentaenoic acid suppress growth and arachidonic acid metabolism in human prostatic adenocarcinoma cells: Possible implications of dietary fatty acids," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids*, vol. 72, no. 5, pp. 363–372, 2005.
- [114] C. B. Bergmann and C. B. McReynolds, "sEH-derived metabolites of linoleic acid drive pathologic inflammation while impairing key innate immune cell function in burn injury," 2022.
- [115] C. B. McReynolds *et al.*, "Plasma Linoleate Diols Are Potential Biomarkers for Severe COVID-19 Infections," *Front. Physiol.*, vol. 12, no. April, pp. 1–8, 2021.
- [116] P. H. Cui, N. Petrovic, and M. Murray, "The ω -3 epoxide of eicosapentaenoic acid inhibits endothelial cell proliferation by p38 MAP kinase activation and cyclin D1/CDK4 down-regulation," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 162, no. 5, pp. 1143–1155, Mar. 2011.
- [117] K. Wagner, B. Inceoglu, and B. D. Hammock, "Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception.," *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 96, no. 1–4, pp. 76–83, Nov. 2011.
- [118] G. Zhang *et al.*, "Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 16, pp. 6530–6535, 2013.
- [119] W. Wang *et al.*, " ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer," *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 113–115, pp. 13–20, 2014.
- [120] M. S. O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma," *Cell*, vol. 79, no. 2, pp. 315–328, 1994.
- [121] R. Xia *et al.*, "Inhibition of pancreatic carcinoma growth through enhancing ω -3 epoxy polyunsaturated fatty acid profile by inhibition of soluble epoxide hydrolase," *Anticancer Res.*, vol. 39, no. 7, pp. 3651–3660, 2019.
- [122] Q. Zhang, D. B. Stovall, K. Inoue, and G. Sui, "The oncogenic role of Yin Yang 1.," *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 16, no. 3–4, pp. 163–97, 2011.
- [123] M. Joo *et al.*, "Yin Yang 1 enhances cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 292, no. 5, May 2007.
- [124] Y. P. Gye and J. W. Christman, "Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases," *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 290, no. 5. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, May-2006.
- [125] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. DuBois, "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells," *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 705–716, May 1998.
- [126] M. AJ *et al.*, "Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase 2, and Vascular Endothelial Growth Factor in the Angiogenesis of Non-Small Cell Lung Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 12, 2000.

- [127] Y. C. Wu *et al.*, “Co-overexpression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin e Synthase-1 adversely affects the postoperative survival in non-small cell lung cancer,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 5, no. 8, pp. 1167–1174, 2010.
- [128] C. Giaginis *et al.*, “Hu-antigen receptor (HuR) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human non-small-cell lung carcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients’ survival,” *Tumor Biol.*, vol. 36, no. 1, pp. 315–327, 2014.
- [129] C. Zhang *et al.*, “YY1 mediates TGF- β 1-induced EMT and pro-fibrogenesis in alveolar epithelial cells,” *Respir. Res.*, vol. 20, no. 1, Nov. 2019.
- [130] A. Rodríguez-Barbero, F. Dorado, S. Velasco, A. Pandiella, B. Banas, and J. M. López-Novoa, “TGF- β 1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells,” *Kidney Int.*, vol. 70, no. 5, pp. 901–909, Sep. 2006.
- [131] S. Colak and P. ten Dijke, “Targeting TGF- β Signaling in Cancer,” *Trends in Cancer*, vol. 3, no. 1. Cell Press, pp. 56–71, 01-Jan-2017.
- [132] X. Zhang *et al.*, “Cyclooxygenase 2 Promotes Proliferation and Invasion in Ovarian Cancer Cells via the PGE2/NF- κ B Pathway,” *Cell Transplant.*, vol. 28, no. 1_suppl, pp. 1S-13S, 2019.
- [133] T. Aoki *et al.*, “Prostaglandin E2-EP2-NF- κ B signaling in macrophages as a potential therapeutic target for intracranial aneurysms,” *Sci. Signal.*, vol. 10, no. 465, pp. 1–18, 2017.