



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Trabajo Final de Grado

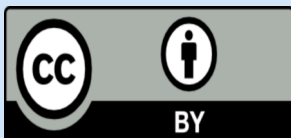
Gutiérrez, Ludmila

Efecto del inhibidor de la actividad de la enzima ACSL4 sobre la progresión tumoral y la importancia de ACSL4 como blanco terapéutico en modelos celulares de cáncer colorrectal

Instituto de Ciencias de la Salud

2025

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Gutiérrez, L. (2025). *Efecto del inhibidor de la actividad de la enzima ACSL4 sobre la progresión tumoral y la importancia de ACSL4 como blanco terapéutico en modelos celulares de cáncer colorrectal* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3622>



Instituto de Ciencias de Salud

Trabajo final de la carrera de Bioquímica

**“Efecto del inhibidor de la actividad de la enzima ACSL4 sobre la
progresión tumoral y la importancia de ACSL4 como blanco terapéutico en
modelos celulares de cáncer colorrectal.”**

Alumna: Gutiérrez Ludmila

Director: Dr. Orlando Ulises

Co- Director: Dr. Ventimiglia Fernando

Fecha de entrega: 27/11/2025

Resumen.

El siguiente trabajo analiza el efecto de la actividad de la enzima ACSL4 (Acil CoA sintetasa 4) sobre la progresión tumoral y su importancia. Se realizaron determinaciones de niveles de proteínas y activación de las vías de señalización (fosforilación) por western blot y ensayos de proliferación celular (MTT) en modelos celulares de cáncer colorrectal derivados de adenocarcinoma (DLD-1, SW480, Caco-2) y metástasis pulmonar (T84).

Evaluando los resultados del Western blot se seleccionaron las líneas celulares de estudio para el análisis del comportamiento del inhibidor de ACSL4, PRGL493 en DLD-1 y SW480 que expresan ACSL4, COX-2 y 5-LOX de manera diferencial, estas enzimas metabolizan el ácido araquidónico (AA), que es un ácido graso poliinsaturado, y juegan un papel directo en la progresión tumoral y su actividad se asocia a con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal.

Además, se evaluaron las vías de señalización WNT y mTOR, estas interactúan indirectamente con el metabolismo del ácido araquidónico (AA), principalmente a través de la regulación de procesos celulares como la inflamación, la proliferación y la supervivencia celular. La vía WNT/ β -catenina, junto con la señalización de COX-2/prostaglandina, interactúa en diversos cánceres, promoviendo el crecimiento tumoral y la angiogénesis, y a su vez afectan la acumulación nuclear de β -catenina. La vía mTOR, a través de la cascada PI3K/Akt, también puede modular la expresión de componentes del metabolismo del AA, con su metabolismo de lípidos puede ser un precursor del AA, que se libera de los fosfolípidos de membrana y luego se metaboliza por enzimas como la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) para producir eicosanoides, promoviendo el crecimiento tumoral.

Dado el rol fundamental de estos blancos moleculares en la proliferación tumoral, se espera que su inhibición reduzca la capacidad proliferativa de las células en estas líneas. Los experimentos realizados en este estudio demostraron que la combinación del inhibidor de la enzima ACSL4, PRGL493, con distintos fármacos que bloquean enzimas del metabolismo del AA y de vías de señalización celular —como mTOR y β -catenina/WNT— evidencia el papel de ACSL4 en la posible regulación de diversas rutas implicadas en la progresión tumoral. Esta combinación podría representar una estrategia efectiva para inhibir la proliferación celular en líneas de CCR.

Palabras clave: cáncer colorrectal, ACSL4, Ácido araquidónico, ciclooxigenasa 2, lipooxigenasa 5, PGRL493, vía mTOR, vía WNT, DLD-1, Caco-2, T84, SW480, progresión celular (MTT), western blot, progresión tumoral.

Agradecimientos

A mi querida UNAJ que como institución me dio las herramientas para poder hacer real y posible esta meta, en estos tiempos de precarización nunca nos abandonaron, ni dejaron de ser una universidad de calidad.

A los docentes, que me aconsejaron, confiaron más en mí que yo misma, y además de enseñarnos todo, nos contienen y sostienen, eso ya es un montón en este largo camino, donde uno va creciendo y madurando, serán parte de mi historia siempre.

A mi director Ulises, al cual admiro, aprendí muchísimo y al equipo de INBIOMED por la oportunidad, el espacio, el apoyo y la confianza.

A mi prima Lucia, que siempre estará en mis pensamientos en cada cumpleaños, reunión familiar y mis mayores logros.

A mis padres, que siempre son un gran apoyo para mí, y los amo.

A mi tía Alcira, mujer que admiro, que siempre me marcó el camino, espero ser algún día tan sabia y generosa como lo es ella con todos.

A mi familia, mis tíos/a, mi hermano que me dio los sobrinos más bellos Malenita, Bezaleel, Bebuchi, Uziel y Aron. A todos que siempre me apoyaron y sin ellos nada sería posible.

A mi psicóloga, ella siempre me daba una sacudida de realidad todas las veces que quise darme por vencida, enseñándome a hacerme cargo de mis decisiones, creer en mí.

A mis colegas, compañeros y amigos.

Las de siempre Eli y Meli.

Mis facuamigos que me acompañaron todos estos años y fui conociendo en distintas temporadas universitarias y siguen vigentes, las bioquis; Pili, Deby, Yani, Carla C, Carlita R, Neide, Malena, Vicky, La Blanco, Flor, Naty y Cony. Los doctores Carlitos y Adrián que compartimos cursadas y trabajo, todos me han hecho reír muchísimo siempre.

Índice

Resumen	2
Agradecimientos	3
1. Marco teórico	5
1.1. Anatomía del colon	5
1.1.1 Secciones del colon	5
1.1.2 Anatomía Microscópica	6
1.2. Cáncer colorrectal	7
1.3. Acil CoA Sintetasa 4 (ACSL4)	10
1.4. Rol de ACSL4 en el metabolismo del ácido araquidónico (AA)	12
1.5. La Importancia de los Metabolitos del Ácido Araquidónico en la Tumorigénesis	14
1.6. Ácido araquidónico importancia en el CCR	15
1.7. ACSL4 y cáncer	16
1.8. ACSL4 y CCR	17
1.9. Líneas celulares	18
1.9.1 Características generales de las líneas celulares	19
2. Objetivos	20
3. Materiales y métodos desarrollados	21
3.1 Reactivos generales	21
3.1.1 Medios de cultivo	21
3.1.2 Soluciones de uso frecuente	21
3.2 Cultivos celulares	21
4. Metodología general	22
4.1 Análisis de proteínas	22
4.2 Western blot	23
4.3 Ensayo de proliferación celular (ensayo MTT)	24
4.4 Tinción de ADN con fluorocromo DAPI (Clorohidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol)	24
5. Discusión de resultados.	25
5.1. Resultados de la detección de mycoplasma por método de tinción DAPI	25
5.2. Análisis de Western blot	26
5.3. Análisis curva dosis-respuesta	28
5.4. Análisis de Proliferación Celular frente a Combinaciones de Fármacos	29
5.4.1 Efectividad de las Combinaciones de Fármacos	30
6. Conclusiones	32
7. Bibliografía	32

1. Marco teórico

1.1 Anatomía del colon

El colon es una parte del intestino grueso que se extiende desde la unión ileocecal hasta el ano. Su función principal es la absorción de agua y electrolitos de los alimentos parcialmente digeridos, así como la eliminación de los residuos sólidos. El colon se divide en varias secciones, cada una con características anatómicas y funcionales específicas. *(Todd M. Hoagland, PhD. et al, 2025)*

1.1.1 Secciones del Colon

- Colon Ascendente: es la primera sección del colon y se encuentra en la parte derecha de la cavidad abdominal. Mide aproximadamente 15-20 cm de largo y se extiende desde el ciego hasta el ángulo hepático.
- Colon Transverso: es la sección más larga del colon y se extiende desde el ángulo hepático hasta el ángulo esplénico. Está suspendido por el mesocolon transverso y tiene una longitud aproximada de 50 cm.
- Colon Descendente: se encuentra en la parte izquierda de la cavidad abdominal y se extiende desde el ángulo esplénico hasta la cresta ilíaca. Tiene una longitud de aproximadamente 25-30 cm.
- Colon Sigmoide: es la sección final del colon y se encuentra en la pelvis. Tiene forma de S y se extiende desde la cresta ilíaca hasta el recto.

Mesenterios del Colon

- Mesocolon Transverso: es un pliegue peritoneal que une el colon transverso con la pared abdominal posterior.
- Mesocolon Sigmoide: es un pliegue peritoneal que une el colon sigmoide con la pared abdominal posterior. *(Todd M. Hoagland, PhD. et al, 2025)*

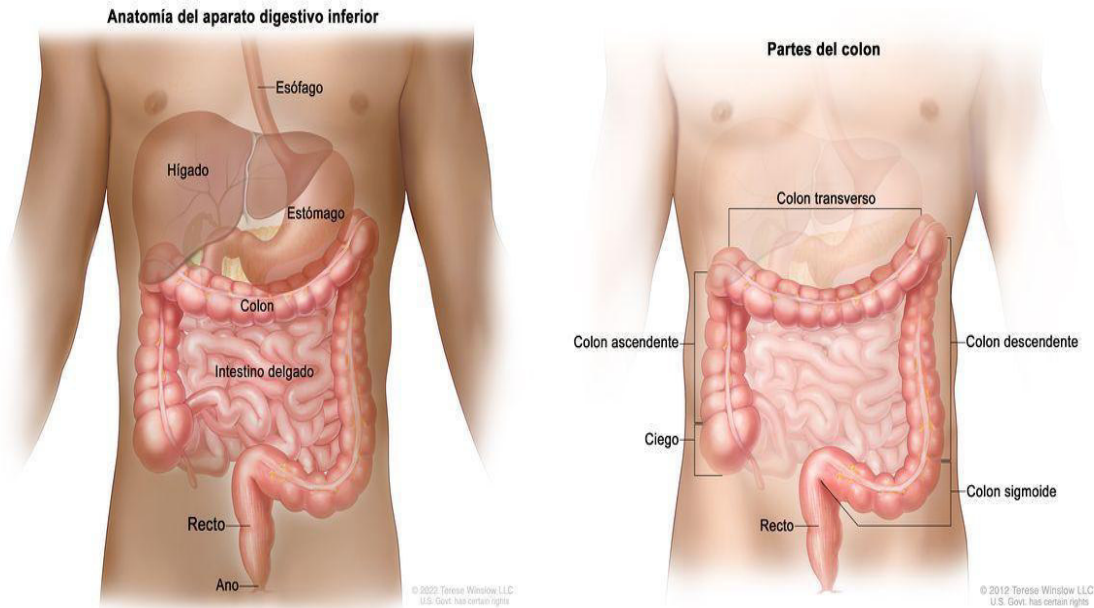


Figura 1: Anatomía del aparato digestivo (gastrointestinal) inferior. Se observan el colon, el recto y el ano. También se muestran otros órganos que forman parte del aparato digestivo (imagen izquierda). El colon comprende el colon ascendente, el ciego, el colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoide y el recto (imagen derecha). (fuente: NCI. <https://www.cancer.gov>)

1.1.2 Anatomía Microscópica

La pared del colon está compuesta por cuatro capas:

- La mucosa: es la capa más interna del colon y está compuesta por un epitelio columnar simple que recubre la superficie luminal del colon.
- La submucosa: es una capa de tejido conectivo que se encuentra debajo de la mucosa y contiene vasos sanguíneos y nervios.
- La muscular propia: es una capa muscular que se encuentra debajo de la submucosa y está compuesta por músculos circulares y longitudinales.
- La serosa: es la capa más externa del colon y está compuesta por un peritoneo visceral.

El colon es un órgano complejo con una anatomía específica que permite su función. Su estructura histológica y anatómica es fundamental para entender su función y patologías asociadas (Todd M. Hoagland, PhD. et al, 2025).

1.2 Cáncer colorrectal

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022, el 3^{er} tipo de cáncer más frecuente fue el colorrectal (1,9 millones de casos) y fue la 3^{er} principal causa de muerte (900.000 decesos aproximadamente). En Argentina, según el CIIC, en el año 2022, el cáncer colorrectal (CCR) fue el 2^{do} tipo de cáncer más frecuente en ambos sexos y el 2^{do} con mayor mortalidad (*Morris V K. et al., 2022*) (Figura 2). El CCR es una enfermedad que se estima que aumentará en un 60% para el año 2030 (*Salim, H. et al., 2015*).

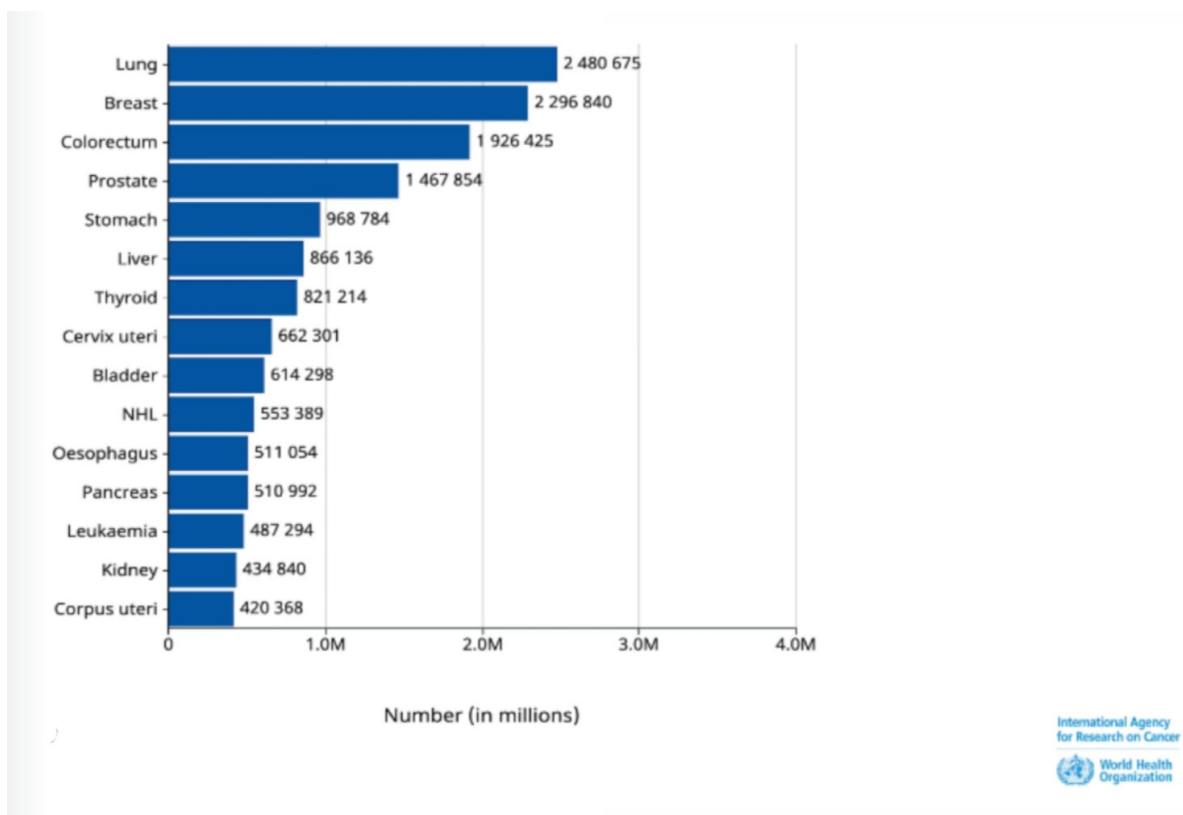


Figura 2: Gráfica de Incidencia de cáncer para las principales localizaciones topográficas en varones y mujeres estimadas por la IARC en 2022. Número total de casos en millones (Ferlay J et al., 2024). (Imagen OMS: CCI. Fuente: cáncer today/ IARC – <http://gco.iarc.who.int/today> Data versión: Globocan 2022)

Los adenocarcinomas son particularmente significativos, ya que constituyen más del 90% de los casos de CCR. Estos tumores se desarrollan como lesiones malignas en las células

epiteliales glandulares del intestino grueso, que incluye el colon y el recto, y la mayoría de los casos son esporádicos (60-65%), sin antecedentes familiares (He, L. et al., 2018). Se califica en estadios, siendo el 0 de menor agresividad y 4 el de mayor agresividad tumoral. El tratamiento para este tipo de cáncer depende, en gran medida, del estadio en que se encuentra (Figura 3). En pacientes con CCR en estadio 0, se encuentran células anormales en la capa interna de la pared del colon, estas células pueden convertirse en cancerosas y extenderse a las capas más profundas de la pared del colon, el cáncer de colon en estadio 0 también se llama carcinoma localizado del colon, el tratamiento principal es generalmente la cirugía de extirpación del tumor y la quimioterapia se puede usar después de la cirugía, como tratamiento adyuvante. En estadio 1 se extiende hacia la segunda o tercera capa de la pared del colon, no hay cáncer en los ganglios linfáticos cercanos ni fuera del colon. En estadio 2 el cáncer se extiende hacia la cuarta capa de la pared del colon o más allá, como en el estadio 1 no hay cáncer en los ganglios linfáticos cercanos ni fuera del colon. En cambio, en estadio 3 encontramos que el cáncer se ha extendido desde el colon a los ganglios linfáticos cercanos o hay metástasis tumorales. Las metástasis tumorales son pequeños tumores de la grasa que rodea al colon y por último, en estadio 4 se disemina fuera del colon, a ganglios linfáticos cercanos, suele extenderse al hígado o a los pulmones, estos son los tumores de mayor agresividad y de peor pronóstico, y la quimioterapia es el principal tratamiento. Los regímenes que se usan incluyen diferentes drogas como 5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino, docetaxel, leucovorina, irinotecán (Morris V K. et al., 2022). También se combinan terapias con anticuerpos anti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) como bevacizumab, anti EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), cetuximab (Morris V K. et al., 2022) y radioterapia. En pacientes con altos niveles de inestabilidad de microsatélites en tumores se usa inmunoterapia con pembrolizumab, nivolumab o dostarlimab (Takei, S. et al., 2022). Las diferentes terapias y sus combinaciones mejoraron las expectativas de vida de pacientes, pero debido a la progresión del tumor, el principal desafío para estos tratamientos es el desarrollo de resistencia.

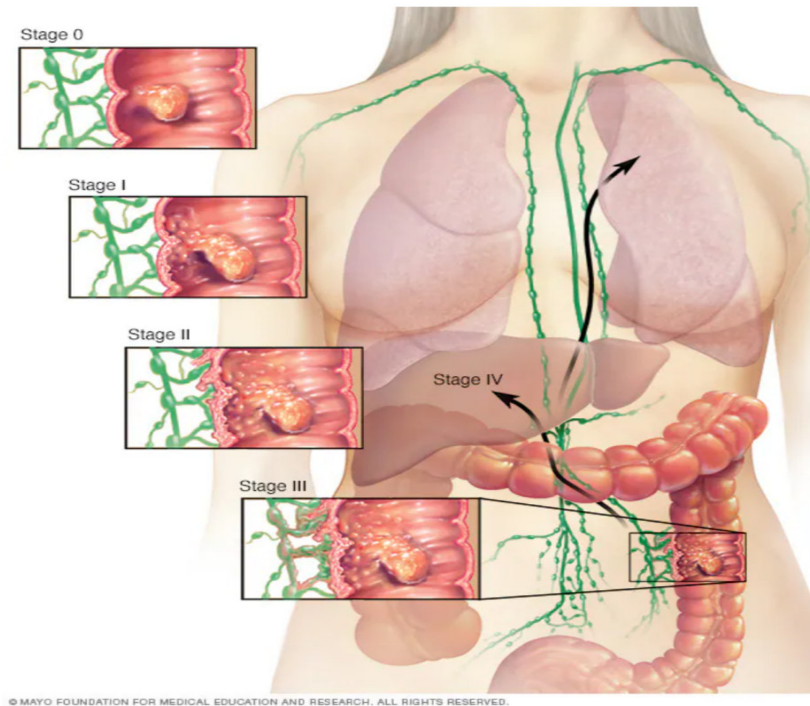


Figura 3: Etapas del cáncer de colon: Los estadios del cáncer de colon van de 0 a 4. En el estadio 0, el cáncer sólo afecta el interior del revestimiento del colon. A medida que el cáncer se disemina, puede atravesar el colon hacia zonas cercanas del cuerpo. El estadio 4 es el más avanzado, implica la diseminación a otros órganos, como el hígado o pulmones. (imagen: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/colon-cancer/diagnosis-treatment>)

El proceso tumoral en colón de mayor frecuencia se inicia a partir de las mutaciones del gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y continúa con la mutación de otros genes como KRAS, TP53 y SMAD4 (*Sun C. et al., 2022*), denominado modelo de Vogelstein. Sin embargo, hay tumores de colon de menor frecuencia que se originan a partir de mutaciones en el gen BRAF e inestabilidad de microsatélites (*Liu C. et al., 2021*).

En estadios iniciales de la enfermedad, mutaciones en el gen APC producen cambios en la vía de señalización Wnt, asociada a la capacidad proliferativa de las células (*Li H. et al., 2021*). Mutaciones en KRAS y sobreexpresión de COX-2 están implicadas en la desregulación de la relación VEGF/VEGFR, que resulta en el aumento de la proliferación y migración en células asociadas a CCR (*Jiang Y. et al., 2023*). La descripción de mecanismos asociados a la progresión tumoral permite estudiar estrategias de tratamientos. Los estudios han establecido una conexión entre la desregulación de las vías de señalización y las alteraciones en el

genotipo celular debido a genes mutados, que están asociados con el desarrollo del CCR. Por lo tanto, es crucial desarrollar estrategias farmacológicas que apunten a proteínas expresadas en las etapas tempranas de la enfermedad y que estén involucradas en la tumorigénesis. En este contexto, ACSL4 se expresa durante las primeras fases del desarrollo del CCR (*Rahman, M. et al., 2012*).

1.3 Acil CoA Sintetasa 4 (ACSL4)

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso esencial y un componente principal de las membranas biológicas, formando parte de lípidos complejos como los fosfolípidos. El AA está formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces *cis* en las posiciones 5, 8, 11 y 14. Puede ser liberado de las membranas por la fosfolipasa A2 (PLA2), siendo el sustrato común de la síntesis de los eicosanoides, una familia de lípidos con un papel clave en la fisiología y fisiopatología celular (*Minekura H. et al., 2001; Hisanaga Y. et al., 2004*). Las células controlan rigurosamente los niveles de AA libre debido a su actividad biológica y a la de sus metabolitos, los eicosanoides. De esta manera la disponibilidad de este ácido graso es con frecuencia un paso limitante de la velocidad en la generación de eicosanoides (*Cao Y. et al., 2000*). En contraste a lo observado para otros ácidos grasos, los niveles de AA libre en el citoplasma son bajos comparados con la cantidad de ésteres de este (*Cao Y. et al., 2000*).

La producción de araquidonoil-CoA (AA-CoA) a partir de AA es catalizada por la ACSL4 y requiere la utilización de una molécula de ATP. ACSL4 posee una fuerte preferencia por el AA como sustrato. La reacción catalizada por esta enzima involucra la formación de un intermediario AA-AMP y luego se produce el intercambio de AMP por CoA para producir AA-CoA activado. De esta forma se activa el AA para que pueda participar en reacciones metabólicas. En síntesis, los dos pasos de reacción que se llevan a cabo son los siguientes:



El gen que codifica a ACSL4 humana se encuentra en la región Xq22.3-q23 del cromosoma X. Comprende una longitud de 90 kb y contiene 16 exones separados por 15 intrones (Figura 4) (Maloberti P. et al., 2005).

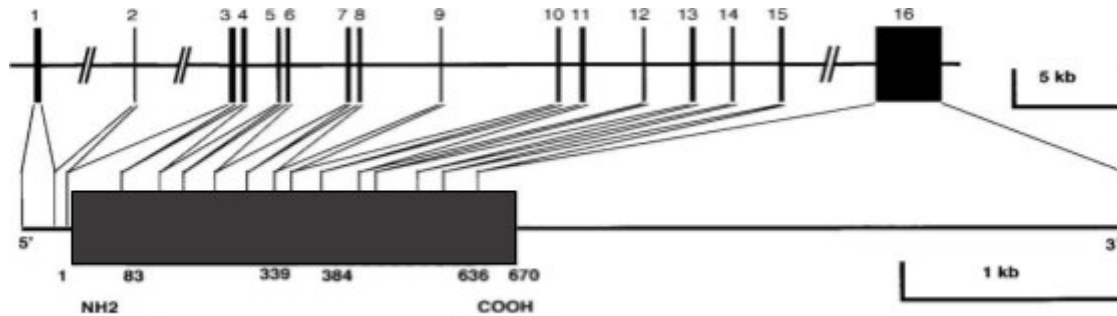


Figura 4. Estructura del gen de ACSL4. Se muestra un esquema del gen de ACSL4 humano. En rectángulos negros numerados se esquematizan a los 16 exones del gen separado por intrones representados por líneas negras horizontales. En la parte inferior se esquematiza el transcripto de la variante corta, en donde el rectángulo gris indica la secuencia codificante con sus respectivos extremos amino y carboxilos terminales. En sus extremos las líneas negras horizontales corresponden a las zonas 5' UTR y 3' UTR. A la derecha se indica una referencia de longitud en kb. (Imagen adaptada de Minekura y col. 2001), (Maloberti P. et al., 2005).

La estructura tridimensional de ACSL4 de mamíferos aún no se ha podido caracterizar por cristalografía. A través de la comparación de la secuencia con una ACSL de origen bacteriano cuya estructura ha sido determinada, se infiere que ACSL4 humana contiene un dominio conservado que determina la especificidad de sustrato, el cual se conoce como “dominio Gate” del AG (Minekura H. et al., 2001; Maloberti PM. et al., 2010).

ACSL4 es una proteína que se expresa preferencialmente en varios tejidos tales como glándula adrenal, epidídimo, cerebro, pulmón, ovario, placenta, y testículos. Su abundancia es notable en células esteroideogénicas (Kuwata H. & Hara S, 2019; Wieckowski MR. et al., 2009; Seeger DR. et al., 2016). Por otro lado, es pobremente expresada en otros tejidos adultos tales como mama, hígado y tracto gastrointestinal en general. Se ha relacionado una expresión anormal de ACSL4 en tejidos no esteroideogénicos con la tumorigénesis y el cáncer (Radif Y. et al., 2018).

En relación a la ubicación subcelular de la enzima, existen varios estudios que revelan que ACSL4 se encuentra enriquecida en subdominios especializados del retículo endoplásmico que mantienen un estrecho contacto físico con las mitocondrias (Küch EM. et al., 2013). Estos subdominios se conocen como las membranas del retículo endoplásmico asociadas a

mitocondrias (MAMs) las cuales son importantes para el anabolismo de lípidos intracelulares y la homeostasis del Ca^{2+} (*Khan WA. et al., 1995*). Las MAMs están altamente enriquecidas en ACSL4 (*McPhail LC. et al., 1984*) y esta enzima ha sido descrita como un marcador específico de estas estructuras (*Murakami K. et al., 1985*). Sin embargo, existe también una fuerte evidencia de que ACSL4 puede localizarse en otros sitios y organelas, dentro de estas ubicaciones se encuentran los endosomas, los microsomas, los peroxisomas y la membrana plasmática (*Khan WA. Et al., 1995; Nomura T. & Ogata H, 1976*).

1.4 Rol de ACSL4 en el metabolismo de ácido araquidónico

El AA cumple un papel importante como segundo mensajero, ya que puede mimetizar la acción del agonista u hormona que desencadenó su liberación (*Wada M. et al., 2007*). Esta acción puede ser directa (*Klett EL et al., 2013; Klett EL. et al., 2017*) o a través de sus metabolitos, los eicosanoides. Estos ejercen un control complejo en una diversidad de procesos fisiológicos. Los eicosanoides están relacionados a procesos inflamatorios, reacciones alérgicas, autoinmunidad y cáncer, ejerciendo sus efectos principalmente a nivel local a través de la interacción con receptores acoplados a proteína G en la superficie celular o con receptores nucleares (*Hisanaga Y. et al., 2004; Maloberti P. et al., 2006*).

Las vías involucradas en la biosíntesis de eicosanoides son complejas. Varias enzimas encargadas de metabolizar el AA, tales como la fosfolipasa A2 (PLA₂), ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX) y citocromo P450 están involucradas en la síntesis de estos compuestos (*Duarte A. et al., 2012*) (Figura 5). En general, el AA liberado después de la activación celular es metabolizado por COX o LOX, y luego el AA oxidado es convertido en eicosanoides bioactivos por cada enzima eicosanoide sintasa terminal (*Duarte A. et al., 2012*) (Figura 5).

A diferencia de la biosíntesis de eicosanoides a través de la vía PLA₂ mencionada anteriormente, la regulación de la liberación de AA de las células esteroideogénicas puede utilizar una vía alternativa de liberación de AA mediada por la vía ACSL4-acil-CoA tioesterasa mitocondrial (ACOT2) en lugar de la vía PLA₂ (*Kuwata H. & Hara S, 2019*). En esta vía alternativa, ACSL4 cataliza la conversión de AA libre intracelular en AA-CoA y se la proporciona a ACOT2, que libera AA en las mitocondrias. El AA

liberado, a su vez, es metabolizado por la vía de la lipoxigenasa para inducir la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) (Kuwata H. & Hara S, 2019). La proteína StAR es una enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de la hormona esteroide, que controla el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna, y la expresión de StAR está regulada por AA o sus metabolitos en estas células (Kuwata H. & Hara S, 2019).

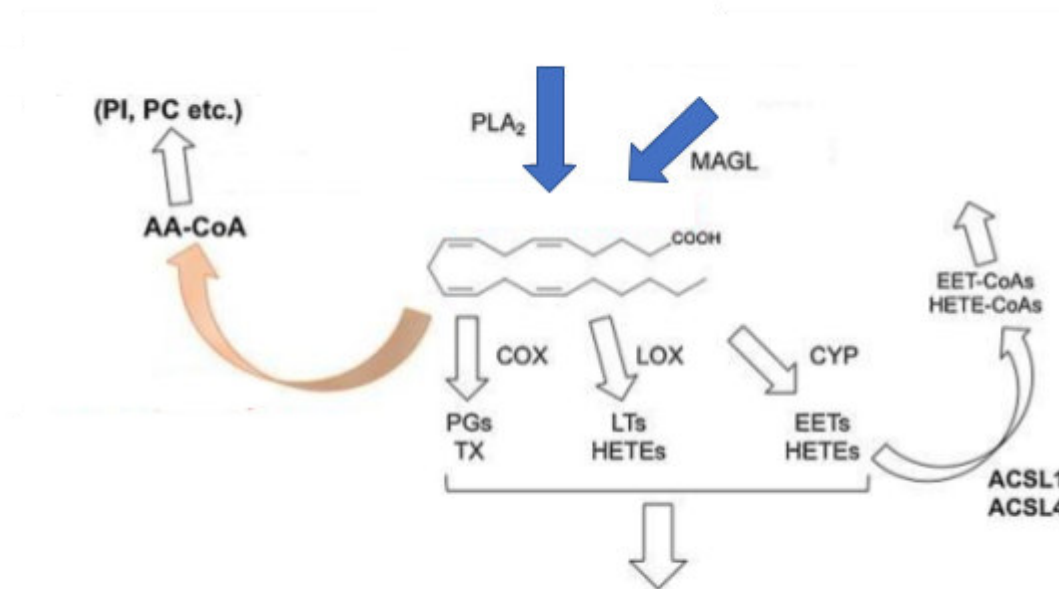


Figura 5. Rol de ACSL4 en la biosíntesis de eicosanoides. En la figura se muestran un resumen de las vías de síntesis del ácido araquidónico y sus principales metabolitos. Se señalan las enzimas que participan. ACSL4: acil-CoA sintetasa 4, COX: ciclooxigenasa, CYP: citocromo P450, EET: ácidos epoxieicosatrienoicos, HETEs: ácidos hidroxi eicosatetraenoicos, LOX: lipoxigenasa, LT: leucotrienos, MAGL: monoacilglicerol lipasa, PG: prostaglandinas, PLA2: fosfolipasa A2, TX: tromboxano. (Imagen adaptada de Hiroshi Kuwata et al. 2019).

Dado que ACSL4 juega un rol importante como regulador de los niveles de AA intracelulares y la síntesis de eicosanoides, ACSL4 esterifica principalmente el AA en AA-CoA, reduciendo los niveles intracelulares de AA libre, lo que contradice la necesidad de metabolitos de AA en la tumorigénesis. El primer hallazgo novedoso es que ACSL4 regula la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de prostaglandina en células MDA-MB-231 (Reddy DS. & Estes WA., 2016), su actividad impacta sobre las diferentes y amplias gamas de funciones en las que los mismos están involucrados.

ACSL4 en la esteroidogénesis y el metabolismo del AA juega un papel crucial. En este mecanismo, AA-CoA es transportado a la mitocondria unido a la proteína DBI, proteína de

unión a acil CoA que se expresa en altas concentraciones en las células esteroidogénicas, (Kolmer, M. et al., 1995; Gwynne, J.T. & B. Hess, 1980; Knudsen, J. et al., 1989) la proteína DBI es ligando de traslocador protein TSPO, localizada en la membrana mitocondrial externa (Papadopoulos, V. 1993; Papadopoulos, V., 1998; (Veenman, L. & M. Gavish, 2012). En la mitocondria la enzima ACOT2 hidroliza el AA-CoA, liberando AA en el interior de la mitocondria (Figura 6) (Maloberti, P. et al., 2005; Maloberti, P. et al., 2002; Castillo, A.F., et al., 2006; Cornejo M. F, 2005).

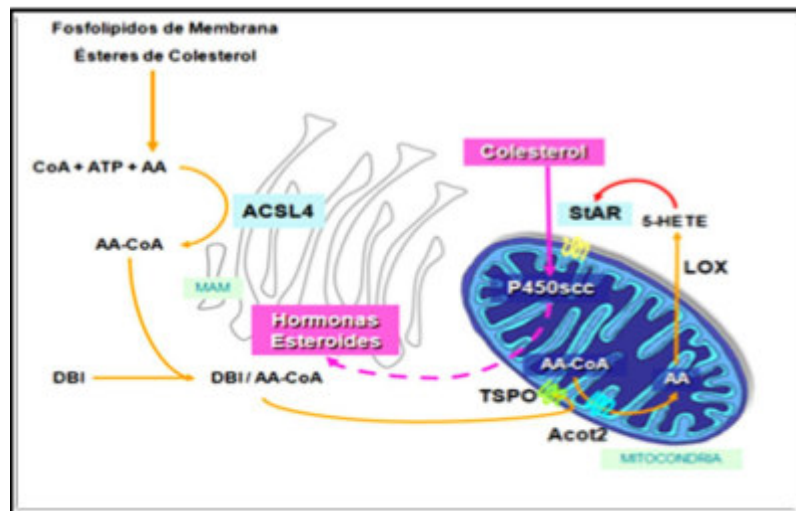


Figura 6. Modelo de liberación de AA al interior de la mitocondria y su relación con la esteroidogénesis. Esquema tomado y modificado de "ACSL4" Maloberti P.M., Castillo A.F., Orlando U., Podesta E.J. (2016). Choi S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, New York, NY.

1.5 La Importancia de los metabolitos del AA en la tumorigénesis

Se ha establecido claramente que los metabolitos del AA están involucrados en la tumorigénesis (Prescott, S. M., & Fitzpatrick, F. A., 2000), y las enzimas que metabolizan este ácido graso poliinsaturado, como la COX-2 y la 5-LOX, juegan un papel directo en la progresión tumoral (Okawa, T. et al., 2004; Jang, J. H. et al., 2021). Además, su actividad se asocia con una menor supervivencia en pacientes con CCR (Sui, H. et al., 2011).

En este contexto, se ha determinado una fuerte correlación entre el aumento de expresión de COX-2 y mutaciones en APC (Kim, H. et al., 2013) y KRAS en adenomas colorrectales, asociando esto a la progresión de adenomas a estadios más agresivos de la enfermedad (Chen,

Z. S. & Tiwari, A. K., 2011). Respecto a 5-LOX, se ha observado en modelos de cáncer pulmonar que mutaciones en KRAS no sólo están asociadas al aumento de expresión de la enzima sino también al aumento del receptor de su principal metabolito, LTB4 (Rius, M. et al., 2008).

Resulta interesante explorar en qué condiciones las enzimas COX-2 y 5-LOX pueden ser empleadas como blancos terapéuticos, dado que participan en diversos procesos relacionados con la tumorigénesis.

1.6 Ácido araquidónico y su importancia en el cáncer colorrectal

El AA puede promover la metástasis y la invasión tumoral al ser precursor de prostaglandina E2 (PGE2) a través de la enzima COX. La PGE2 induce la expansión de células madre cancerosas mediante la activación de Nf-κB y promueve la formación de metástasis hepáticas en ratones (Wang, D. et al., 2015). La COX-2 es una enzima clave en este proceso. Se ha demostrado que COX-2 está regulada positivamente en el cáncer de colon y en varios otros tipos de cáncer (Jasperson, K. W. et al., 2010; Grady, W. M. & Carethers, J. M., 2008), y múltiples líneas de evidencia indican que es un paso temprano crítico en la carcinogénesis de colon, como se menciona en estudios previos (Jasperson, K. W. et al., 2010). Además, una mutación nula de COX-2 provocó una reducción significativa en el tamaño y el número de pólipos en ratones mutantes APC, y el tratamiento con inhibidores específicos de COX-2 provocó una reducción dependiente de la dosis en el número y tamaño de los pólipos intestinales y colónicos en ratones mutantes APC.

Estos estudios en modelos animales sugieren fuertemente que la inducción de COX-2 es un paso temprano en la carcinogénesis de colon. Además de la vía COX-2, también se ha demostrado que otras vías metabólicas que utilizan AA como sustrato están asociadas con la carcinogénesis.

La 5-lipooxigenasa (5-LOX) es una enzima clave en la vía de los leucotrienos del AA. Su actividad enzimática promueve la tumorigénesis, lo que sugiere que la inhibición de 5-LOX podría ser una estrategia efectiva para prevenir y tratar el cáncer. La 5-LOX tiene efectos protumorales, lo que significa que su actividad enzimática puede promover el crecimiento y el desarrollo del tumor. Por lo tanto, la inhibición de la 5-LOX podría ser una forma de reducir el crecimiento y el desarrollo del tumor (Xia Q. et al., 2024).

En resumen, el metabolismo del AA juega un papel importante en la carcinogénesis del cáncer colorrectal, así como COX-2, 5- LOX es una enzima clave en este proceso. La inhibición de la COX-2, 5- LOX y otras vías metabólicas que utilizan AA como sustrato pueden ser estrategias terapéuticas prometedoras para el tratamiento del cáncer colorrectal.

1.7 ACSL4 y cáncer

En condiciones fisiológicamente normales, la enzima ACSL4 se expresa durante el desarrollo fetal en la embriogénesis y morfogénesis del cerebro, apagando su expresión al nacimiento (*Lam, I. H. et al., 2024; Wang, X. J. et al., 2003; Cao, Y. et al., 2000*). Durante la adultez, ACSL4 se expresa principalmente en los tejidos esteroideogénicos (*Tang, Y. et al., 2018*).

Se ha identificado un mecanismo de regulación de los niveles de AA en un compartimento específico de la célula, como es la mitocondria. En este mecanismo, la enzima marcapasos es ACSL4, que esterifica el AA para producir AA-CoA (*Cao, Y. et al., 2001*). En la mitocondria, el AA-CoA es utilizado como sustrato por ACOT2, generando AA intramitocondrial (*Cao, Y. et al., 2001*) para la producción de eicosanoides (*Dai, G. et al., 2022*). Se sugiere que la compartimentalización del AA en diferentes organelas podría ser un mecanismo para controlar los niveles de este ácido graso y su metabolización por las enzimas COX-2 (*Monaco, M. E. et al., 2010*) y 5-LOX, esta última implicada en la regulación de la esteroideogénesis (*Dai, G. et al., 2022*). Sin embargo, el aumento de expresión de la enzima ACSL4 en tejidos no esteroideogénicos se relaciona con la desregulación del metabolismo lipídico y la progresión tumoral en cáncer de mama, próstata, hepatocelular y colon (*Masters JR., 2012*).

ACSL4 activa ácidos grasos de cadena larga para iniciar una serie de vías metabólicas lipídicas intracelulares (*Kuwata H. & Hara S., 2019; Rossi Sebastiano M. & Konstantinidou G., 2019*). Las evidencias emergentes mostraron que la expresión desregulada de ACSL4 estaba estrechamente asociada con varias enfermedades y especialmente con cánceres (*Rossi Sebastiano M. & Konstantinidou G., 2019; Dattilo MA. et al., 2019; Orlando UD. et al., 2019*). Los mecanismos de participación de ACSL4 en el desarrollo tumoral pueden incluir vías dependientes del hierro, no apoptóticas y de muerte celular (*Doll S. et al., 2017*), resistencia a fármacos (*Orlando UD. et al., 2019*), tumorigénesis dependiente del AA (*Orlando UD. et al., 2012*), producción de esteroides (*Wang W. et al., 2019*) y activación de vías de señalización procáncer (*Wu X. et al., 2015*). De hecho, el valor predictivo de ACSL4

en varios cánceres ha sido revelado por un análisis de múltiples bases de datos (Yu Y. et al., 2022). Específicamente, ACSL4 está correlacionado positivamente con la infiltración inmune en el microambiente tumoral, que está intensamente relacionado con el pronóstico en el carcinoma invasivo de mama y el melanoma cutáneo de la piel. Existe relación entre ACSL4 y diferentes tipos de cáncer. En cáncer de pulmón, la baja expresión de ACSL4 tiene un mal pronóstico en el adenocarcinoma de pulmón (Zhang Y. et al., 2021). En CCR, la línea celular mutante KRAS muestra una regulación positiva significativa de ACSL4 (Park S. et al., 2018), en carcinoma hepatocelular (CHC) los tiempos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad de pacientes con CHC con alta expresión de ACSL4 se acortan significativamente (Calvisi DF. Et al., 2011; Matter MS. et al., 2014; Wang J. et al., 2020). En cáncer de cuello uterino, la alta expresión de ACSL4 promueve la sensibilidad de las células del cáncer cervical a la quimioterapia (Xiaofei J. et al., 2021), y en cáncer de próstata la regulación negativa de ACSL4 inhibe la proliferación, migración, invasión y crecimiento de células de cáncer de próstata no dependientes de receptor de andrógeno (Baron A. et al., 2004; Currie E. et al., 2013).

1.8 ACSL4 y CCR

Las líneas celulares tumorales de CCR presentan una expresión significativamente mayor de ACSL4 en comparación con las líneas celulares epiteliales normales del colon (Orlando, U. D. et al., 2019).

Además, en muestras de pólipos de pacientes, se ha observado que la expresión de ACSL4 aumenta durante la transición de adenoma a adenocarcinoma, mostrando una correlación directa con la expresión de COX-2. Esta relación sugiere una conexión entre la sobreexpresión de ACSL4 y la carcinogénesis colorrectal (Nguyen, H. T. & Duong, H. Q., 2018). Estudios previos también predicen que una mayor expresión de ACSL4 se asocia con una menor supervivencia en pacientes con CCR (Harizi H. et al., 2008).

Se ha demostrado que ACSL4 modula la expresión del receptor VEGFR en CCR, y su manipulación en células HCT116 influye en la proliferación e invasión celular, lo que vincula a ACSL4 con la progresión tumoral (Lengauer C., et al., 1997). En términos de regulación y respuesta terapéutica, las células de CCR con mutaciones en KRAS presentan niveles elevados de ACSL4, y su inhibición ha demostrado mejorar la eficacia de los tratamientos en estas células (Issa JP, 2004).

El análisis sistemático y el experimento *in vitro* confirmaron que la alta expresión de ACSL4 predijo un peor pronóstico en el CCR y la regulación negativa de ACSL4 podría reducir la proliferación e invasión celular (*Chen WC. et al., 2016*). A diferencia de los roles parcialmente positivos de ACSL4 en el cáncer de mama, una mayor expresión de ACSL4 resultó en la proliferación y migración de células de CCR acompañada de un tiempo de supervivencia más corto en pacientes con cáncer colorrectal (*Sánchez-Martínez R. et al., 2017*).

En este contexto, resulta fundamental investigar si la sobreexpresión de ACSL4, a través de la regulación de diversos mecanismos moleculares, contribuye a aumentar la agresividad celular al modificar el fenotipo del CCR. Además, es crucial evaluar cómo eventos tempranos, como las mutaciones, y tardíos, como los tratamientos antitumorales, pueden influir en la expresión de esta enzima.

1.9 Líneas celulares

Las líneas celulares son herramientas invaluableles en la investigación biomédica y tienen la capacidad ser utilizadas para el estudio de drogas debido a que diferentes modelos celulares de CCR tienen modificaciones genéticas que se encuentran en muestras de paciente. Se ha determinado que líneas celulares provenientes de pacientes con CCR, tienen mutados oncogenes clave como APC (Adenomatous Polyposis Coli), KRAS (KRAS Proto-Oncogene), TP53 (Tumor Protein P53), PIK3CA (Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha Polypeptide) y detectado estabilidad e inestabilidad microsatelital (MSE y MSI, respectivamente). Diferentes estudios proporcionaron características moleculares detalladas de un gran número de líneas celulares de cáncer de colon, facilitando la selección de modelos *in vitro* adecuados para la investigación (*Liu Y & Bodmer WF, 2006*).

Recolectamos la información relevante de las líneas celulares de cáncer de colon, de nuestro interés para este trabajo, En la tabla 1 son clasificadas por las vías moleculares CIN (Inestabilidad Cromosómica), MSI (Inestabilidad de Microsatélites) y CIMP (Fenotipo con Metilación de Islas CpG), y el estado de mutación de genes críticos para el cáncer. Estas serán sometidas a diferentes desafíos con el inhibidor de ACSL4 (PGRL493) y distintos fármacos como ibuprofeno, zileuton, XVA939 y rapamicina, seleccionados en función de sus características particulares (*Ahmed, D. et al., 2013*).

1.9.1. Características generales de las líneas celulares

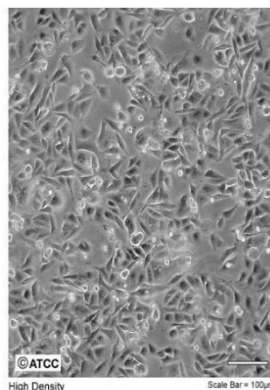
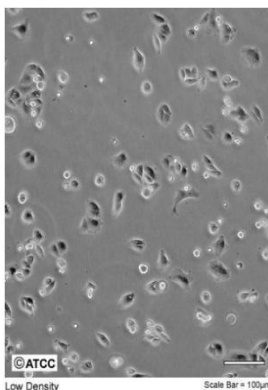
T84 es una línea celular adherente derivada de la metástasis pulmonar de un paciente con carcinoma de colon. Esta línea celular es trasplantable y se utiliza ampliamente en la investigación del cáncer de colon. Estas células crecen en monocapas confluentes que presentan uniones estrechas y desmosomas entre células adyacentes, lo que las hace útiles en la investigación gastrointestinal.

Caco-2 es una línea celular adherente aislada de tejido de colon derivado de un paciente con adenocarcinoma colorrectal. Estas células expresan características de diferenciación enterocítica tras la confluencia y son una línea comúnmente utilizada para imitar el intestino delgado en el sistema gastrointestinal (GI). Las células Caco-2 se utilizan en diversas áreas de investigación, como la transfección viral, el transporte de fármacos y la inflamación.

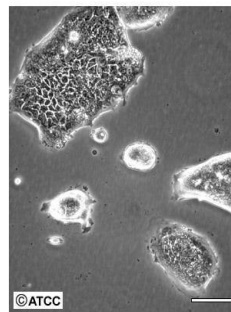
DLD-1 es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal aislada del intestino grueso de un paciente con adenocarcinoma de colon y puede utilizarse en la investigación del cáncer.

SW480 aisladas del intestino grueso de un paciente con CCR Dukes C y que pueden utilizarse en la investigación del cáncer.

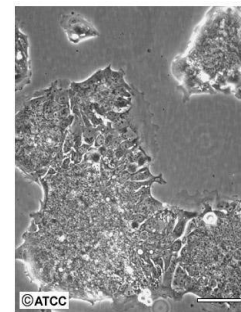
ATCC Number: CCL-228
Designation: SW 480



ATCC Number: CCL-248
Designation: T84



Low Density Scale Bar = 100µm



High Density Scale Bar = 100µm

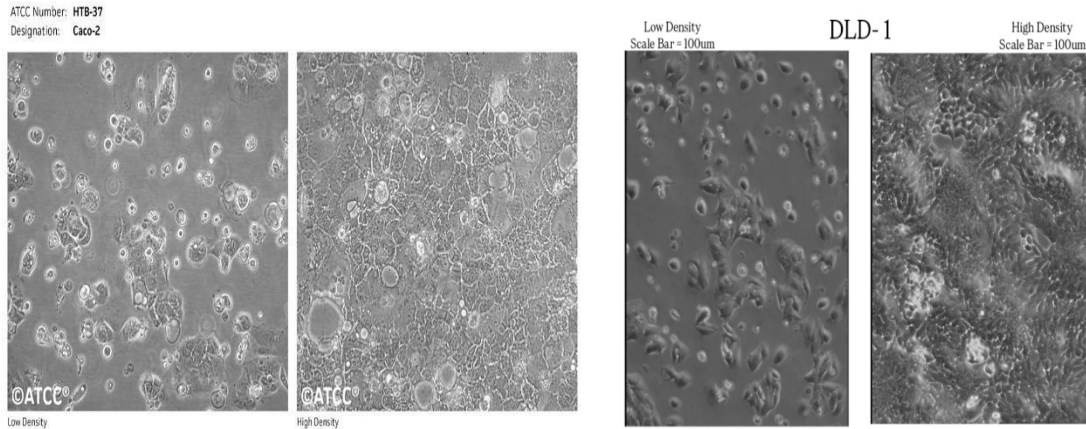


Figura 7. Líneas celulares de CCR. Imágenes microscópicas obtenidas de ATCC de las líneas de CCR utilizadas en este trabajo. Las imágenes muestran a cada línea celular sembrada en baja densidad (izquierda) y en alta densidad (derecha) respectivamente.

Líneas celulares	MSI Status	CIMP Panel 1	CIMP Panel 2	CIN	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN	TP53
SW480	MSI	+	+	-	G13D	WT	E545K D549N	WT	S241F
DLD-1	MSS	+	+	+	WT	V600E	P449T	WT	R273H
CACO-2	MSS	-	-	+	G12V	WT	WT	WT	R273H P309S
T84	MSS	¿?	¿?	¿?	G13D	WT	WT	¿?	¿?

(CIN= Vía de inestabilidad cromosómica; MSI= Microsatélites de inestabilidad; MSS; Microsatélite estable; CIMP= Fenotipo metilador de isla CpG; WT= Tipo silvestre)

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer de colon clasificadas por las vías moleculares CIN, MSI y CIMP, y el estado de mutación de genes críticos para el cáncer. (Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., Lothe, R. A. (2013).)

2. Objetivos

- ✓ Estudiar la expresión diferencial de proteínas asociadas al metabolismo del AA como ACSL4, COX-2 y 5-LOX en células de CCR.
- ✓ Analizar la activación de las vías de señalización mTOR y WNT en las diferentes líneas celulares de CCR.
- ✓ Evaluar la respuesta de células tumorales a inhibidores de la actividad de ACSL4, COX-2 y 5-LOX.
- ✓ Analizar el efecto de inhibidores de las vías de señalización celular mTOR y WNT sobre modelos celulares de CCR.
- ✓ Estudiar la combinación de inhibidores y su efecto sobre la proliferación celular

3. Materiales

3.1 Reactivos generales

3.1.1 Medios de cultivo y soluciones de uso frecuente

Todos los cultivos de células humanas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. El SFB (Fetal Bovine Serum de Gibco™.) fue inactivado previo a su utilización por calor a 56°C. Los pasajes celulares se realizaron con tripsina-EDTA 1X.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose without L-Glutamine de Sartorius.) alta glucosa (1 litro): 13,4 g de Dulbecco's modified Eagle médium alta glucosa; 2 g de NaHCO₃.

DMEM alta glucosa completo: 10%SFB; 10%penicilina-estreptomicina; DMEM alta glucosa para un volumen final de 1 litro

3.1.2 Soluciones amortiguadoras generales

- TBS (Solución amortiguadora salino de Tris) para 1 litro: 20 ml Tris-HCl 1M pH 7,4; 29,22 g NaCl.
- TTBS para 1 litro: 1 litro de TBS; Tween-200, 5%.
- PBS 10X (pH 7.4, el cual se diluye para su uso a 1X con agua destilada para 1 litro): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24gKH₂PO₄.

3.2 Cultivos celulares

En función de la información relevante que recolectamos de cada una de las líneas celulares DLD-1, Caco-2, SW480 (provenientes de tumor primario de CCR) y T84 (metástasis de pulmón proveniente de tumor primario de CCR), se seleccionaron para nuestros diseños de estudio con PGRL493 inhibidor de la enzima ACSL4 (*Castillo, A. F. et al, 2021*), ibuprofeno (droga antiinflamatorio), para inhibir la actividad de COX-2, zileuton (droga que se utiliza en tratamiento de asma), para inhibir 5-LOX, rapamicina inhibidor vía mTOR, XAV-939 inhibidor vía β -catenina/Wnt. Determinamos la concentración mínima efectiva de droga para producir inhibición en la proliferación celular, para luego poder realizar las combinaciones entre las mismas.

4. Metodología general

4.1 Análisis de proteínas

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford (*Bradford MM. Anal Biochem. 1976*), usando BSA como estándar. El método de Bradford es ampliamente utilizado en bioquímica y biología molecular para determinar la concentración de proteínas en muestras biológicas. Es un método rápido y sensible que requiere una cantidad mínima de muestras. Esta técnica se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G250 a las proteínas. Donde la cantidad de proteína es proporcional a la coloración resultante. Aunque el colorante libre puede existir en cuatro formas iónicas diferentes (cuyos valores de pKa son 1.15, 1.82 y 12.4), las tres formas cargadas que predominan en la solución acidificada del ensayo son las formas catiónicas roja y verde tienen una absorbancia máxima a 470 nm y 650 nm respectivamente. En contraste, la forma más aniónica del colorante, que se une a las proteínas, tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Así la cantidad de proteína puede ser estimada si se determina la cantidad de colorante obtenido en su forma iónica azul. Esto se logra usualmente midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm. (*Bradford MM. Anal Biochem. 1976*)

En principio procedimos en la preparación del reactivo de Bradford disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95% más 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se diluyó en 1 litro con agua destilada, seguimos con la curva de calibración, primero se preparó la solución de trabajo de BSA (concentración final: 100 μ g/mL) haciendo una

dilución 1:10 de la solución stock de BSA 1 mg/mL. A partir de la solución de trabajo de BSA (100 µg/mL), se preparó directamente en la microplaca las diluciones para la curva de calibración de acuerdo con lo indicado en la Tabla 2. Cada punto debe realizarse por duplicado. A continuación, para el análisis de muestra agregamos una dilución 1:10 de cada muestra en la multiplaca por duplicado. Y por último se realizó la medición de la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro.

	Curva de calibración (vol final = 100 µL)				
mg/ml BSA	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
µL de solución de trabajo de BSA 100µg/ml	40	30	20	10	5
µL de agua bidestilada	60	70	80	90	95

Tabla 2: Diluciones de la solución de trabajo para construir la curva de calibración.

4.2 Western blot

Los cultivos celulares se lavaron con PBS, se levantaron en buffer RIPA y se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos. La lisis proteica total (30 µg) se separará en SDS-PAGE, y se transferirá a membranas de fluoruro de polivinilideno. Luego se incubó con BSA o leche en polvo sin grasa al 1% en NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y Tween al 0,5% 20 durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. Las membranas se enjuagaron dos veces en NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) y Tween 20 al 0,5% y se incubaron durante la noche a 4 °C con las siguientes diluciones de anticuerpos primarios: 1:1000 anti-ACSL4 (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000 anti-COX-2 (Abcam), 1: 1000 anti-5-LOX (Abcam), 1: 3000 anti-β-tubulina, 1:500 anti-PRS6 (anti- S6 phospho ribosomal) (Origene), 1:1000 anti-β-catenina (Cell Signaling). Los anticuerpos unidos se desarrollaron por incubación con anticuerpos secundarios 1:5000 de cabra anti-conejo (BioRad) (para

anti-COX-2, anti-5-LOX), 1:3000 de cabra anti-conejo (BioRad) (para anti- β -catenina), 1:1000 de cabra anti-conejo (BioRad) (para anti- PRS6) y 1:5000 de cabra anti-ratón (BioRad) (para anti-ACSL4, anti- β -tubulina) *horseradish peroxidase-conjugated* y detectado por quimioluminiscencia.

4.3 Ensayo de proliferación celular (Ensayo MTT)

La proliferación celular se realizó mediante el ensayo de reducción del MTT. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos, en una densidad de 4000 células/pocillo en medio completo. Luego de 24 horas se retiró el medio con suero y se las dejó incubando en DMEM sin SFB, con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Después de 24 horas se realizaron los tratamientos correspondientes en medio completo y las células se cultivaron 48 horas más. Pasado el tiempo se agregó una solución de MTT (5 μ g/ml de MTT en PBS 1x) al medio de cultivo, que será metabolizado en aquellas células que aún conservan funcionalidad mitocondrial. Se incubaron durante 2:30 horas a 37 °C en atmósfera henuficada con 5% CO₂. Los cristales que forman se disolvieron con 200 μ l DMSO, para disolver de forma completa estos cristales, las placas se agitaron vigorosamente durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de microplacas. (multidetecction microplate reader, Synergy HT, Biotek (Winooski, Vermont, USA)).

4.4 Tinción de ADN con fluorocromo DAPI (Clorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol). Identificación de mycoplasma en cultivos celulares.

Primero, se cultivan las células en un cubreobjetos (sin alcanzar la confluencia, ya que es más fácil detectar mycoplasmas si no se cultivan hasta dicha confluencia) se fijan las células, se permeabilizan las células de ser necesario, se lavan 2 a 3 veces con PBS, luego se tiñen añadiendo la solución DAPI 300 nM y se deja incubar durante un corto periodo de 1 a 5 minutos en oscuridad. El DAPI se une al surco menor del ADN bicatenario, en regiones ricas en pares de bases A-T. Finalizada la incubación, se agregó formaldehído dejándolo actuar por 10 minutos, esta solución se descarta y se vuelve a lavar la muestra 2 a 3 veces con PBS. Por último, se visualiza el ADN bajo un microscopio de fluorescencia, donde se excita por luz

ultravioleta, el complejo DAPI-ADN que emite fluorescencia azul brillante, permitiendo así su detección.

5. Discusión de resultados.

5.1 Resultados de la detección de mycoplasma por método de tinción DAPI

La detección de mycoplasma es de gran importancia, ya que en nuestro trabajo se emplearon cultivos celulares, y uno de los problemas más comunes que afecta todos los aspectos de este tipo de cultivos es la contaminación por otros microorganismos. En particular, la contaminación por mycoplasmas resulta especialmente preocupante, pues es difícil de detectar y suele pasar inadvertida, aunque puede alterar de manera significativa las funciones celulares.

Los mycoplasmas son procariotas muy pequeñas y de vida libre (0,2-0,4 μm) que carecen de pared celular, lo que imposibilita su detección a simple vista o incluso al microscopio. Además, no causan turbidez en los medios de cultivo celular, la cual suele acompañar a otros tipos de contaminación de los cultivos celulares. Y lo que es más importante, la infección por mycoplasmas generalmente no produce muerte celular observable. En consecuencia, pueden proliferar y pasar desapercibidos en placas de cultivo celular durante un largo periodo, lo que constituye un obstáculo importante para la realización de experimentos *in vitro* fiables y precisos. Además, los mycoplasmas no son susceptibles a los antibióticos comúnmente utilizados en cultivos celulares. Por lo tanto, es imperativo que las líneas celulares se analicen mensualmente para detectar la presencia de mycoplasma con un método sensible y fiable.

Del ensayo con el método de tinción DAPI obtuvimos imágenes del microscopio de fluorescencia para la línea celular Caco-2 (Figura 7), para la línea celular T-84 (Figura 8) y para la línea celular SW480 (Figura 9), en las cuales no se observó presencia de mycoplasma.

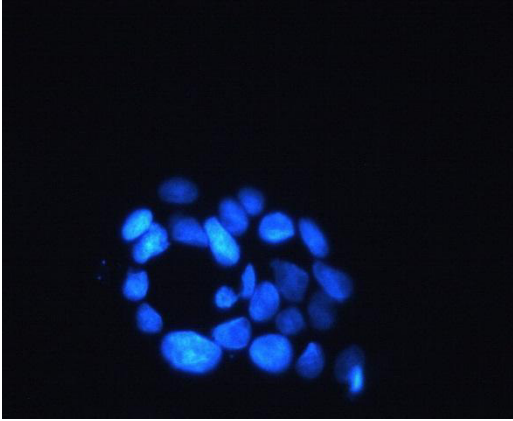


Figura 7: Imagen tomada del microscopio de fluorescencia de la línea celular Caco -2

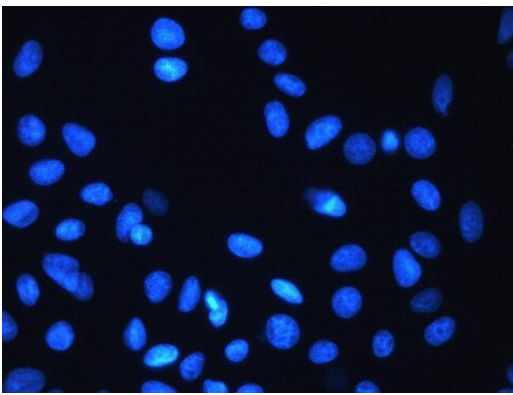


Figura 8: Imagen tomada del microscopio de fluorescencia de la línea celular T-84

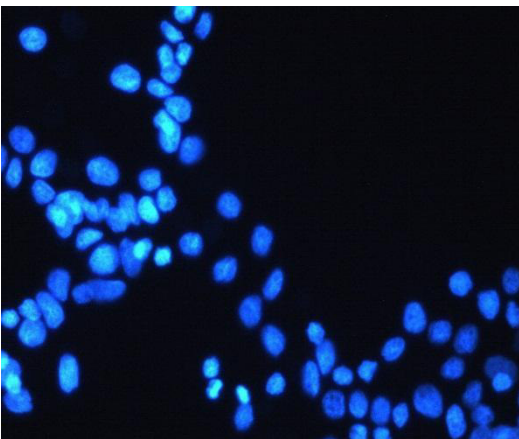


Figura 9: Imagen tomada del microscopio de fluorescencia de la línea celular SW480.

5.2 Análisis de Western blot

Se analizó la expresión de proteínas asociadas al metabolismo del AA, incluyendo ACSL4, COX-2 y 5-LOX (Figura 10A) y la activación de las vías WNT/ β -catenina y mTOR, mediante la determinación de los niveles de β -catenina y de la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Figura 10B). El estudio se llevó a cabo en líneas celulares de CCR derivadas de adenocarcinoma (DLD-1, SW480 y Caco-2) y de metástasis pulmonar (T84).

La proteína β -catenina forma parte del complejo que activa la vía WNT/ β -catenina, translocándose al núcleo para regular la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. En paralelo, la proteína ribosomal S6 es fosforilada por la quinasa S6K, la cual es activada por el complejo mTOR; este proceso es esencial para la activación de la vía y promueve la expresión de genes asociados a la progresión tumoral.

Los resultados obtenidos muestran que ACSL4 se expresa en las cuatro líneas celulares, aunque con niveles diferenciales: la mayor expresión se observó en SW480, seguida por Caco-2, T84 y DLD-1. En cuanto a COX-2, su expresión se detectó únicamente en las líneas Caco-2 y DLD-1, mientras que está ausente en T84 y SW480. Respecto a 5-LOX, las líneas SW480 y Caco-2 mostraron niveles de expresión comparables, mientras que en DLD-1 la expresión fue menor y en T84 resultó prácticamente indetectable (Figura 10A).

El análisis de β -catenina sugiere una activación diferencial de la vía WNT entre las líneas estudiadas: SW480 presentó los niveles más elevados, seguida de Caco-2; en DLD-1 la expresión fue marcadamente inferior y en T84 apenas detectable. La detección de S6 ribosomal fosforilada evidenció una alta activación de la vía mTOR en DLD-1, seguida por Caco-2. La línea SW480 mostró una expresión menor que estas dos, pero superior a la observada en T84 (Figura 10B).

Finalmente, la expresión de β -tubulina, utilizada como control de carga, se detectó en todas las líneas celulares, confirmando la correcta ejecución del protocolo experimental y la eficacia de los anticuerpos en la detección de las proteínas analizadas.

En conjunto, la caracterización de estas proteínas en las líneas T84, DLD-1, SW480 y Caco-2 respalda su uso como modelos adecuados para evaluar el efecto y la eficacia de inhibidores dirigidos a ACSL4, COX-2 y 5-LOX, así como a las vías WNT y mTOR. Dado el rol fundamental de estos blancos moleculares en la proliferación tumoral, se espera que su inhibición reduce la capacidad proliferativa de las células en estas líneas.

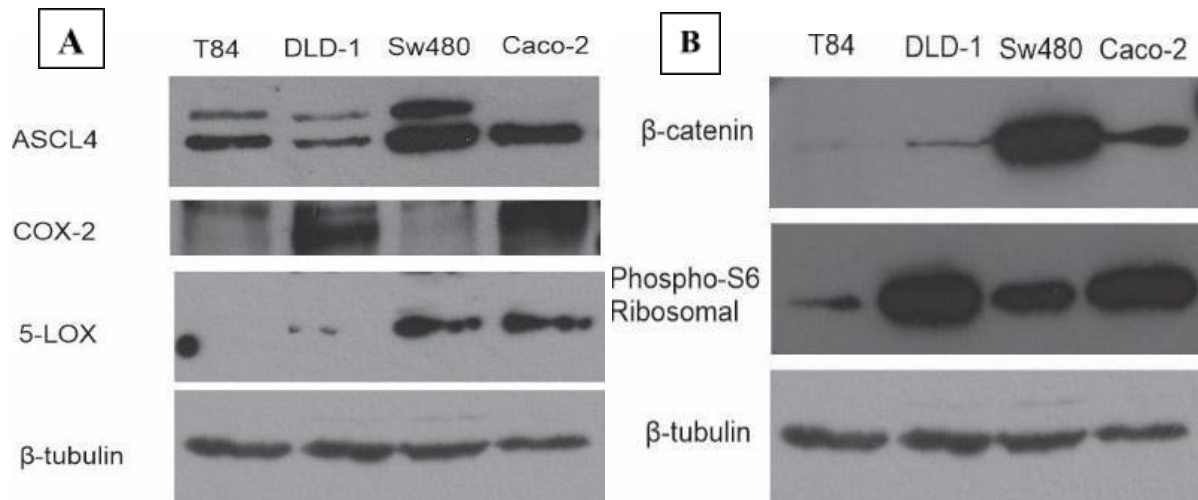


Figura 10. Imágenes de western blot para las líneas celulares T84, SW480, DLD-1 y Caco-2, donde se muestra la expresión diferencial de las proteínas ACSL4, COX-2, 5-LOX (A), y β -catenina, phospho-S6 Ribosomal (B) y la β -tubulina como control de carga para la normalización.

5.3 Análisis de curva dosis-respuesta

En este estudio se evaluó la proliferación celular en las líneas derivadas de adenocarcinoma de colon DLD-1 y SW480, seleccionadas debido a su expresión diferencial de la enzima ACSL4. Con el objetivo de analizar la actividad del inhibidor de ACSL4 PRGL493 sobre la capacidad proliferativa de estas células tumorales, ambas líneas fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μ M) durante 72 horas. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo estándar, y los valores de IC_{50} (concentración inhibitoria media) se estimaron a partir de curvas de dosis-respuesta (Figura 11).

Los resultados obtenidos muestran valores de IC_{50} de 15,99 μ M para DLD-1 y 11,80 μ M para SW480, indicando que SW480 presenta una mayor sensibilidad al inhibidor. Esta diferencia podría asociarse a los niveles más elevados de ACSL4 previamente observados en esta línea celular.

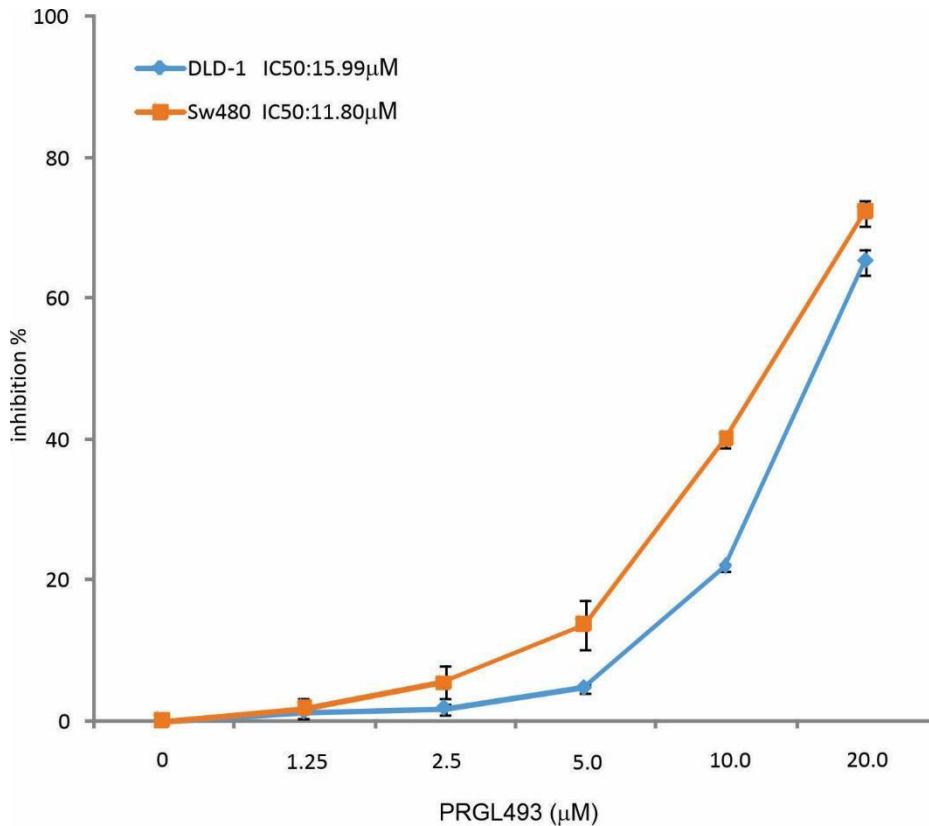


Figura 11: Gráfico dosis- respuesta para PRGL493, un inhibidor de ACSL4, el cual inhibe diferencialmente la proliferación de células CCR DLD-1 y SW480.

5.4 Análisis de proliferación celular frente a diferentes combinaciones de fármacos.

Se evaluó el efecto inhibitorio de diferentes combinaciones farmacológicas sobre la proliferación de las líneas celulares DLD-1 y SW480. Con base en los resultados mostrados en la Figura 10A, se seleccionó la línea DLD-1, caracterizada por la coexpresión de ACSL4 y COX-2, para su tratamiento con concentraciones submáximas de PRGL493 (5 μM; inhibidor de la actividad de ACSL4) e ibuprofeno (300 μM; inhibidor de la actividad de COX-2). En paralelo, la línea SW480, que expresa ACSL4 y 5-LOX, fue tratada con PRGL493 (5 μM) y zileuton (250 μM; inhibidor de 5-LOX), tanto en forma individual como combinada. La inhibición farmacológica simultánea de ACSL4, COX-2 y 5-LOX se presenta en la Figura 13. En las células DLD-1, el tratamiento combinado con PRGL493 e ibuprofeno produjo una disminución significativamente mayor de la proliferación en comparación con los tratamientos individuales, evidenciando un efecto sinérgico. Un comportamiento equivalente

se observó en las células SW480 tratadas con PRGL493 y zileutón en concentraciones submáximas. Todos los ensayos se realizaron durante un período de incubación de 72 horas. Como se observa en la Figura 10B, las vías WNT/ β -catenina y mTOR presentan patrones de activación diferencial entre ambas líneas celulares. En función de estos resultados, se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediante el tratamiento con sus inhibidores específicos: rapamicina (10 nM), dirigida a la vía mTOR, y XVA939 (1.25 μ M), inhibidor de la vía WNT/ β -catenina, aplicados de manera individual y en combinación con PRGL493. Los gráficos de la Figura 14 ilustran el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular bajo los distintos esquemas de tratamiento con PRGL493, rapamicina y XVA939, permitiendo un análisis comparativo de la eficacia de cada agente y de sus combinaciones. Los resultados obtenidos muestran variaciones en el grado de inhibición proliferativa dependiendo del inhibidor empleado y de las combinaciones evaluadas. En la línea celular DLD-1, la combinación PRGL493 con rapamicina produjo una disminución significativa de la proliferación respecto a los tratamientos individuales, evidenciando un efecto sinérgico. Sin embargo, esta sinergia no se observó en la combinación PRGL493 con XVA939, donde la inhibición no difirió significativamente del efecto individual de cada compuesto. En contraste, en la línea SW480, la combinación PRGL493 con rapamicina generó una inhibición de la proliferación, seguida por PRGL493 con XVA939, ambas significativas. No obstante, en esta línea celular no se detectó un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento.

5.4.1 Efectividad de las Combinaciones de Fármacos

Las combinaciones de PGRL493 (5 μ M) con ibuprofeno (300 μ M) y PGRL493 (5 μ M) con zileuton (250 μ M) demostraron una eficacia significativa en las líneas celulares analizadas, evidenciando un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular. En contraste, la combinación de PGRL493 (5 μ M) con rapamicina (10 nM) indujo un efecto sinérgico en la línea celular DLD-1, pero no en SW480. Por último, la combinación de PGRL493 (5 μ M) con XVA939 (1.25 μ M) resultó eficaz exclusivamente en la línea DLD-1, sin embargo, no se observó un efecto sinérgico en este caso.

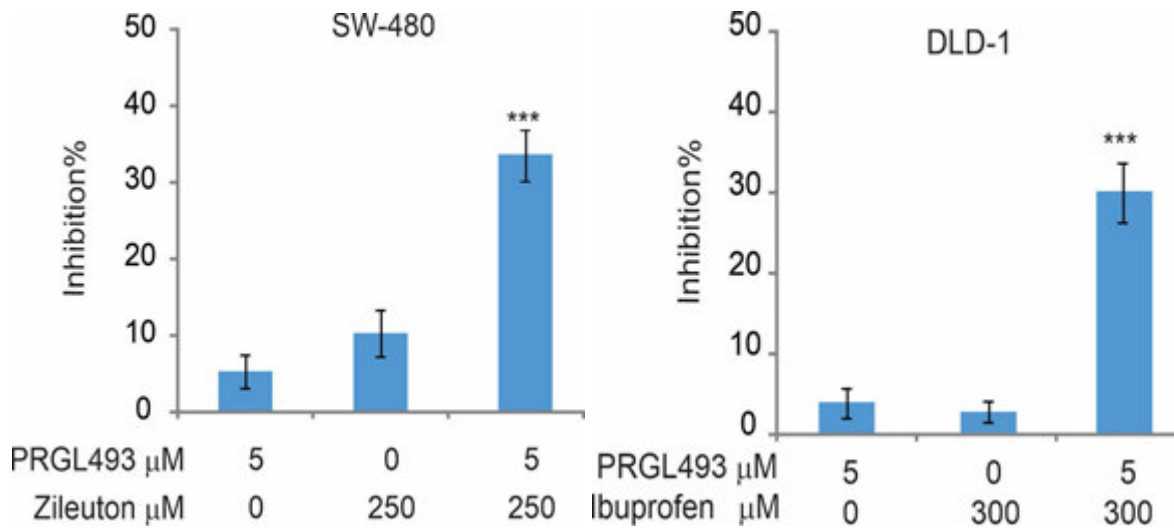


Figura 13: Gráficos de resultados de proliferación celular para las líneas celulares SW480 y DLD-1 en presencia del inhibidor de ACSL4 PRGL493 (5 μM), el inhibidor de COX-2 ibuprofeno (300 μM) y el inhibidor de 5-LOX zileuton (250 μM). La proliferación celular se determinó mediante un ensayo estándar. Los datos representan la media \pm DE. El análisis estadístico compara los tratamientos individuales con los dobles: *** $p < 0,001$

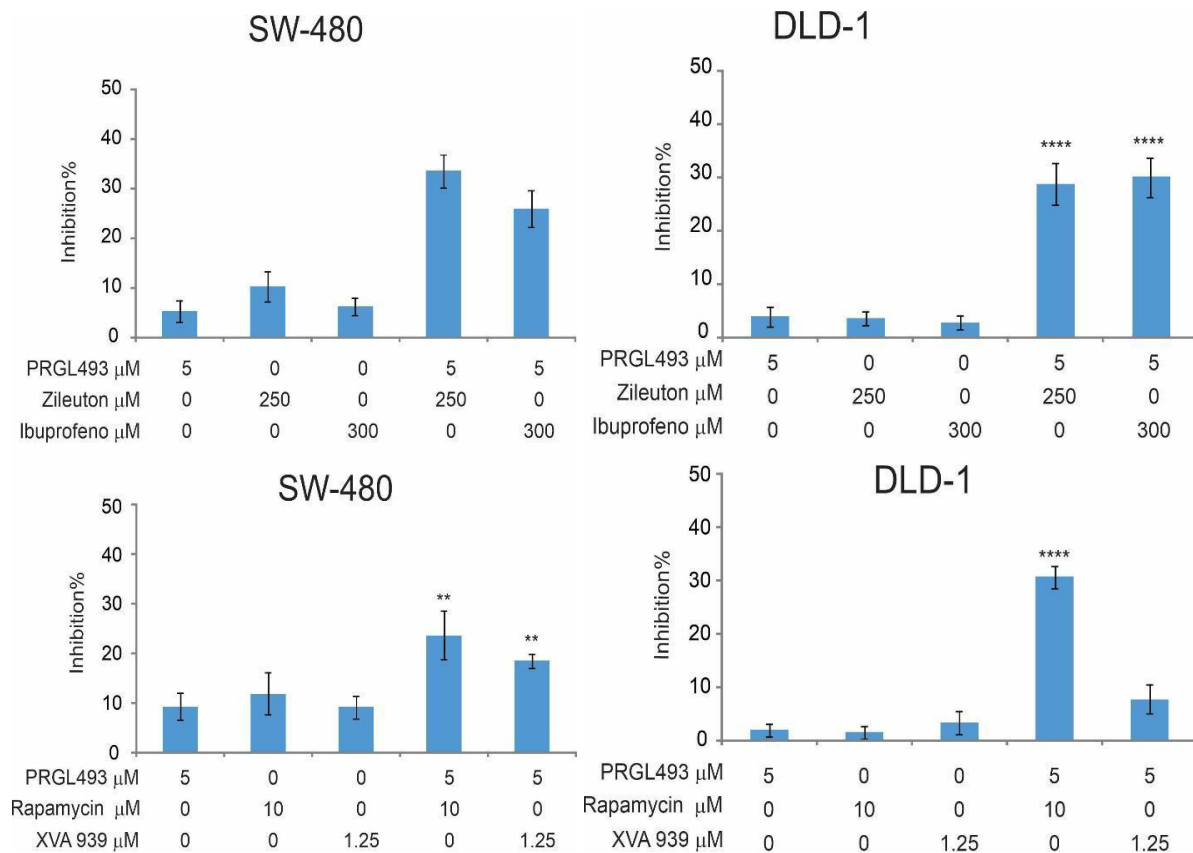


Figura 14: Gráficos de resultados de proliferación celular para las líneas celulares SW480 y DLD-1 en presencia de distintas drogas, PRGL493 5 μ M, rapamicina 10Nm, XVA939 1,25 μ M, ibuprofeno 300 μ M y zileuton 250 μ M, combinados e individuales. La proliferación celular se determinó mediante un ensayo estándar. Los datos representan la media \pm DE. El análisis estadístico compara los tratamientos individuales con los tratamientos dobles: **p < 0,01, ***p < 0,001.

6. Conclusiones

Los experimentos realizados en este estudio demostraron que la combinación del inhibidor de la enzima ACSL4, PRGL493, con distintos fármacos que bloquean enzimas del metabolismo del AA y de vías de señalización celular —como mTOR y β -catenina/WNT— evidencia el papel de ACSL4 en la posible regulación de diversas rutas implicadas en la progresión tumoral. Esta combinación podría representar una estrategia efectiva para inhibir la proliferación celular en líneas de CCR.

Los resultados mostraron que la administración conjunta de PRGL493 con ibuprofeno, zileuton, rapamicina y XVA939 redujo de manera significativa la proliferación celular en las líneas DLD-1 y SW480. Estos hallazgos sugieren que la inhibición simultánea de múltiples vías de señalización podría constituir una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del CCR. Asimismo, los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones orientadas a evaluar la eficacia y seguridad de estas combinaciones farmacológicas en modelos in vivo y en ensayos clínicos.

7. Bibliografía.

- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013)¹⁶⁵.) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24042735/>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of *Anal Biochem*. 1976;72:248-254. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>
- Baron A., Migita T., Tang D., Loda M. (2004). Sintasa de ácidos grasos: ¿un oncogén metabólico en el cáncer de próstata? *J. Cell Biochem*. 91 (1), 47–53. 10.1002/jcb.10708. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14689581/>
- Calvisi DF, Wang C., Ho C., Ladu S., Lee SA, Mattu S., et al. (2011). El aumento de la lipogénesis, inducido por la señalización AKT-mTORC1-RPS6, promueve el desarrollo del carcinoma hepatocelular humano. *Gastroenterology* 140 (3), 1071–1083. 10.1053/j.gastro.2010.12.006 , <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21147110/>
- Cao Y, Murphy KJ, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Expression of fatty acid- CoA ligase 4 during development and in brain. *FEBS Lett*. 2000;467(2-3):263-267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10675551/>
- Cao, Y., Dave, K. B., Doan, T. P. & Prescott, S. M. Fatty acid CoA ligase 4 is up-regulated in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 61, 8429–8434 (2001). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731423/>

- Cao, Y., Pearman, A. T., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11280–5 (2000). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11005842/>
- Castillo, A. F., Orlando, U. D., Maloberti, P. M., Prada, J. G., Dattilo, M. A., Solano, A. R., Bigi, M. M., Ríos Medrano, M. A., Torres, M. T., Indo, S., Caroca, G., Contreras, H. R., Marelli, B. E., Salinas, F. J., Salvetti, N. R., Ortega, H. H., Lorenzano Menna, P., Szajnman, S., Gomez, D. E., Rodríguez, J. B., ... Podesta, E. J. (2021). New inhibitor targeting Acyl-CoA synthetase 4 reduces breast and prostate tumor growth, therapeutic resistance and steroidogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **78**(6), 2893–2910. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03679-5> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33068124/>
- Castillo, A.F., et al., cAMP increases mitochondrial cholesterol transport through the induction of arachidonic acid release inside this organelle in Leydig cells. *FEBS J*, 2006. **273**(22): p. 5011- 21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17087723/>
- Chen WC, Wang CY, Hung YH, Weng TY, Yen MC, Lai MD (2016). Análisis sistemático de las alteraciones en la expresión génica y los resultados clínicos de la familia de la acil-coenzima A sintetasa de cadena larga en el cáncer. *PLoS One* **11** (5), e0155660. 10.1371/journal.pone.0155660 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27171439/>
- Chen, Z. S. & Tiwari, A. K. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.* **278**, 3226–3245 (2011). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21740521/>
- Cornejo Maciel, F., et al., An arachidonic acid-preferring acyl-CoA synthetase is a hormonedependent and obligatory protein in the signal transduction pathway of steroidogenic hormones. *J Mol Endocrinol*, 2005. **34**(3): p. 655-66.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956337/>
- Currie E., Schulze A., Zechner R., Walther TC, Farese RV (2013). Metabolismo celular de ácidos grasos y cáncer. *Cell Metab.* **18** (2), 153–161. 10.1016/j.cmet.2013.05.017 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413113002076/>
- Dai, G. et al. ACSL4 promotes colorectal cancer and is a potential therapeutic target of emodin. *Phytomedicine* **102**, (2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35567995/>
- Dattilo MA, Benzo Y, Herrera LM, Prada JG, Castillo AF, Orlando UD, et al. (2019). Mecanismos reguladores que conducen a la expresión diferencial de acil-CoA sintetasa 4 en células de cáncer de mama. *Ciencia. Rep.* **9** (1), 10324. 10.1038/s41598-019-46776-7 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31311992/>
- Dinarvand N., Khanahmad H., Hakimian SM, Sheikhi A., Rashidi B., Pourfarzam M. (2020). Evaluación de la expresión de la acil-coenzima A sintetasa 4 de cadena larga (ACSL4) en cáncer de mama humano. *Res. Pharm. Sci.* **15** (1), 48–56. 10.4103/1735-5362.278714 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180816/>
- Doll S., Proneth B., Tyurina YY, Panzilius E., Kobayashi S., Ingold I., et al. (2017). ACSL4 determina la sensibilidad a la ferroptosis al modular la composición lipídica celular. *Nat. Chem. Biol.* **13** (1), 91–98. 10.1038/nchembio.2239 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27842070/>
- Duarte A, Poderoso C, Cooke M, et al. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. *PLoS One.* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045829 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23029265/>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, & Bray F. (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39688499/>
- Grady, W. M. & Carethers, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* **135**, 1079–1099 (2008). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18773902/>
- Gwynne, J.T. and B. Hess, The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. *J Biol Chem*, 1980. **255**(22): p. 10875-83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6253490/>

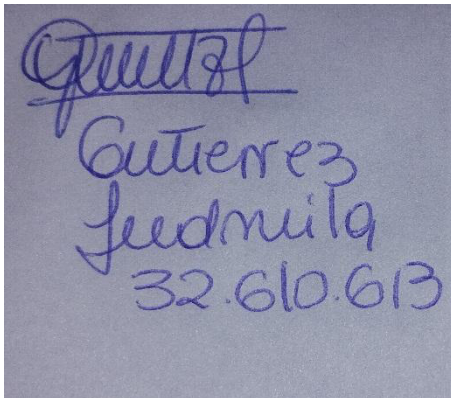
- Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med.* 2008;14(10):461-469. doi:10.1016/j.molmed.2008.08.005 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5018866/>
- Hisanaga Y, Ago H, Nakagawa N, et al. Structural basis of the substrate-specific two- step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31717-31726. doi:10.1074/jbc.M400100200 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15145952/>
- Issa JP. Fenotipo metilador de la isla CpG en el cáncer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15573120/>
- Jang, J. H. et al. Leukotriene B4 receptor-2 contributes to KRAS-driven lung tumor formation by promoting interleukin-6-mediated inflammation. *Exp. Mol. Med.* 53, 1559–1568 (2021). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34635780/>
- Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058 (2010). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20420945/>
- Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal.* 1995;7(3):171-184. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7662506/>
- Kim, H., Park, G. S., Lee, J. E. & Kim, J. H. A leukotriene B4 receptor-2 is associated with paclitaxel resistance in MCF-7/DOX breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 109, 351–359 (2013). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23799854/>
- Klett EL, Chen S, Edin ML, et al. Diminished Acyl-CoA synthetase isoform 4 activity in INS 832/13 cells reduces cellular epoxyeicosatrienoic acid levels and results in impaired glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* Published online 2013. doi:10.1074/jbc.M113.481077 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23766516/>
- Klett EL, Chen S, Yechoor A, Lih FB, Coleman RA. Long-chain acyl-CoA synthetase isoforms differ in preferences for eicosanoid species and long-chain fatty acids. *J Lipid Res.* Published online 2017. doi:10.1194/jlr.M072512 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209804/>
- Knudsen, J., et al., Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochem J*, 1989. 262(2): p. 513-9) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2803267/>
- Kolmer, M., A. Rovio, and H. Alho, The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochem J*, 1995. 306 (Pt 2): p. 327-30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534063/>
- Küch EM, Vellaramkalayil R, Zhang I, et al. Differentially localized acyl-CoA synthetase 4 isoenzymes mediate the metabolic channeling of fatty acids towards phosphatidylinositol. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* Published online 2014. doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.018 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201376/>
- Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2019;144:1-27. doi:10.1016/j.prostaglandins.2019.106363 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31306767/>
- Lam, I. H., Chan, C. I., Han, M., Li, L., & Yu, H. H. (2024). ACSL4 mediates inflammatory bowel disease and contributes to LPS-induced intestinal epithelial cell dysfunction by activating ferroptosis and inflammation. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 19(1), 20240993. <https://doi.org/10.1515/med-2024-0993> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39247444/>
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Inestabilidad genética en cánceres colorrectales. *Naturaleza* 1997;386:623 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9121588/>
- Liu Y, Bodmer WF. Análisis de mutaciones de P53 y su expresión en 56 cánceres colorrectales. *Líneas celulares de cáncer. Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16418264/>

- Liu, C., Xing, W., Yu, H., Zhang, W. & Si, T. ABCB1 and ABCG2 restricts the efficacy of gedatolisib (PF-05212384), a PI3K inhibitor in colorectal cancer cells. *Cancer Cell Int.* 21, (2021). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33593355/>
- Maloberti P, Castilla R, Castillo F, et al. Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J.* 2005;272(7). doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04616.x <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15794766/>
- Maloberti P, Maciel FC, Castillo AF, et al. Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;265-266:113-120. doi:10.1016/j.mce.2006.12.026 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2978721/>
- Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, et al. Functional interaction between acyl-coa synthetase 4, lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in the aggressive phenotype of breast cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(11):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0015540 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085606/>
- Maloberti PM, Duarte AB, Orlando UD, Pasqualini ME, Solano AR, López-Otín C., et al. (2010). Interacción funcional entre la acil-CoA sintetasa 4, las lipooxigenasas y la ciclooxigenasa-2 en el fenotipo agresivo de las células de cáncer de mama. *PLoS One* 5 (11), e15540. 10.1371/journal.pone.0015540, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085606/>
- Maloberti, P., et al., Concerted regulation of free arachidonic acid and hormone-induced steroid synthesis by acyl-CoA thioesterases and acyl-CoA synthetases in adrenal cells. *Eur J Biochem*, 2002. 269(22): p. 5599-607. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12423359/>
- Maloberti, P., et al., Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J*, 2005. 272(7): p. 1804-14. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15794766/>
- Masters JR. Autenticación de líneas celulares: poner fin al escándalo de las líneas celulares falsas. *Nature* 2012; 492: 186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144066/>
- Matter MS, Decaens T, Andersen JB, Thorgeirsson SS (2014). Dirigirse a la vía mTOR en el carcinoma hepatocelular: estado actual y tendencias futuras. *J. Hepatol.* 60 (4), 855–865. 10.1016/j.jhep.2013.11.031, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11630751/>
- McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R. A potential second messenger role for arachidonic acid: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Trans Assoc Am Physicians.* 1984;97:222-231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6242084/>
- Minekura H, Kang MJ, Inagaki Y, et al. Exon/intron organization and transcription units of the human acyl-CoA synthetase 4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(1):80-86. doi:10.1006/bbrc.2001.5357 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11485311/>
- Monaco ME, Creighton CJ, Lee P, Zou X, Topham MK, Stafforini DM (2010). La expresión de la sintetasa 4 de acil-CoA de cadena larga en cáncer de mama y próstata se asocia con la negatividad del receptor de hormonas esteroideas sexuales. *Transl. Oncol.* 3 (2), 91–98. 10.1593/tlo.09202
- Monaco, M. E. et al. Expression of Long-chain Fatty Acyl-CoA Synthetase 4 in Breast and Prostate Cancers Is Associated with Sex Steroid Hormone Receptor Negativity. *Transl. Oncol.* 3, 91–98 (2010). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20360933/>
- Morris V K., Takei, S., Kawazoe, A. & Shitara, K. The New Era of Immunotherapy in Gastric Cancer. *Cancers (Basel).* 14, (2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35205802/>
- Nguyen, H. T. & Duong, H. Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol. Lett.* 16, 9–18 (2018). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29928381/>
- Nomura T, Ogata H. Distribution of prostaglandins in the animal kingdom. *Biochim Biophys Acta.* 1976;431(1):127-131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5152/>
- Okawa, T. et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is related to polypoid growth and K-ras gene mutation in T1 colorectal carcinomas. *Dis. Colon Rectum* 47, 1915–1921 (2004). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15622585/>

- Orlando UD, Garona J., Ripoll GV, Maloberti PM, Solano Á. R., Avagnina A., et al. (2012). La interacción funcional entre la acil-CoA sintetasa 4,5-lipooxigenasa y la ciclooxigenasa-2 controla el crecimiento tumoral: una nueva diana terapéutica. *PLoS One* 7 (7), e40794. [10.1371/journal.pone.0040794](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040794)
- Orlando UD, Castillo AF, Medrano MAR, Solano AR, Maloberti PM, Podesta EJ (2019). La acil-CoA sintetasa-4 está implicada en la resistencia a fármacos en líneas celulares de cáncer de mama mediante la regulación de la expresión de transportadores dependientes de energía. *Biochem. Pharmacol.* 159, 52–63. [10.1016/j.bcp.2018.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.005) <https://bicyt.conicet.gov.ar/fichas/produccion/12280958/>
- Orlando, U. D. et al. Acyl-CoA synthetase-4 is implicated in drug resistance in breast cancer cell lines involving the regulation of energy-dependent transporter expression. *Biochem. Pharmacol.* 159, 52–63 (2019). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30414939/>
- Papadopoulos, V., Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev*, 1993. 14(2): p. 222-40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8391980/>
- Papadopoulos, V., Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. 217(2): p. 130-42 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9452136/>
- Park S., Oh J., Kim M., Jin EJ (2018). La bromelina suprime eficazmente el cáncer colorrectal con mutación Kras mediante la estimulación de la ferroptosis. *Anim. Cells Syst. Seoul.* 22 (5), 334–340. [10.1080/19768354.2018.1512521](https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1512521) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460115/>
- Prescott, S. M. & Fitzpatrick, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1470, (2000). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10722929/>
- Radif Y, Ndiaye H, Kalantzi V, et al. The endogenous subcellular localisations of the long chain fatty acid-activating enzymes ACSL3 and ACSL4 in sarcoma and breast cancer cells. *Mol Cell Biochem.* Published online 2018. doi:10.1007/s11010-018-3332-x <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29450800/>
- Ragab HM, Samy N., Afify M., El Maksoud NA, Shaaban HM (2018). Evaluación de Ki-67 como posible biomarcador en pacientes con cáncer de mama. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 16 (2), 479–484. [10.1016/j.jgeb.2018.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.002) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30733763/>
- Reddy DS, Estes WA. Clinical Potential of Neurosteroids for CNS Disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(7):543-561. doi:10.1016/j.tips.2016.04.003 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2714614/>
- Rius, M., Hummel-Eisenbeiss, J. & Keppler, D. ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 86–94 (2008). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17959747/>
- Rossi Sebastiano M., Konstantinidou G. (2019). Dirigiendo la terapia contra el cáncer a las sintetasas de acil-CoA de cadena larga. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (15), 3624. [10.3390/ijms20153624](https://doi.org/10.3390/ijms20153624) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3417883/>
- Sánchez-Martínez R., Cruz-Gil S., García-Álvarez MS, Reglero G., Ramírez de Molina A. (2017). Isoformas complementarias de ACSL contribuyen a un estado energético ventajoso no warburg que caracteriza a las células de cáncer de colon invasivo. *Sci. Rep.* 7 (1), 11143. [10.1038/s41598-017-11612-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11612-2) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28894242/>
- Sui, H. et al. COX-2 contributes to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 32, 667–675 (2011). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296766/>
- Sun, C. et al. Treatment of Advanced BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Where We Are and Where We Are Going. *Clin. Colorectal Cancer* 21, 71–79 (2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35277355/>
- Tang, Y., Zhou, J., Hooi, S. C., Jiang, Y. M. & Lu, G. D. Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-coa synthetases (review). *Oncol. Lett.* 16, 1390–1396 (2018). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30008815/>

- (Todd M. Hoagland, PhD. et al., 2025) <https://emedicine.medscape.com/article/1949039-overview#showall>. Marzo 2025. Todd M. Hoagland, PhD
- Veenman, L. and M. Gavish, The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr Mol Med*, 2012. 12(4): p. 398-412.) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22348610/>
- Wang J., Wang Z., Yuan J., Wang J., Shen X. (2020). La retroalimentación positiva entre la expresión de ACSL4 y la O-GlcNAcilación contribuye al crecimiento y la supervivencia del carcinoma hepatocelular. *Aging (Albany NY)* 12 (9), 7786–7800. 10.18632/aging.103092 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32357142/>
- Wang W., Hao X., Han L., Yan Z., Shen WJ, Dong D., et al. (2019). La ablación tisular específica de ACSL4 produce alteraciones en la esteroidogénesis. *Endocrinology* 160 (11), 2517–2528. 10.1210/en.2019-00464 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31504388/>
- Wang, D., Fu, L., Sun, H., Guo, L., & DuBois, R. N. (2015). Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology*, 149(7), 1884–1895.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.064>
- Wang, X. J., Dyson, M. T., Jo, Y., Eubank, D. W. & Stocco, D. M. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 159–166 (2003). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12943700/>
- Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc*. Published online 2009. doi:10.1038/nprot.2009.151 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19816421/>
- Wu X., Deng F., Li Y., Daniels G., Du X., Ren Q., et al. (2015). ACSL4 promueve el crecimiento, la invasión y la resistencia hormonal del cáncer de próstata. *Oncotarget* 6 (42), 44849–44863. 10.18632/oncotarget.6438 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26636648/>
- Xia, Q., Gao, W., Yang, J., Xing, Z., & Ji, Z. (2024). The deregulation of arachidonic acid metabolism in ovarian cancer. *Frontiers in oncology*, 14, 1381894. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1381894>
- Xiaofei J., Mingqing S., Miao S., Yizhen Y., Shuang Z., Qinhua X., et al. (2021). El ácido oleanólico inhibe la proliferación de células HeLa de cáncer cervical mediante la modulación de la vía de señalización de ferroptosis ACSL4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 545, 81–88. 10.1016/j.bbrc.2021.01.028 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33548628/>
- (Yiran Z, et al, 2023) Arachidonic acid metabolism in health and disease [Yiran Zhang, Yingxiang Liu, Jin Sun, Wei Zhang, Zheng Guo, Qiong Ma](https://doi.org/10.1002/mco2.363) First published: 20 September 2023 <https://doi.org/10.1002/mco2.363>
- Yu Y., Sun X., Chen F., Liu M. (2022). Alteración genética, papel pronóstico e inmunológico del miembro 4 de la familia de la acil-CoA sintetasa de cadena larga en un análisis pancáncer. *Front. Genet.* 13, 812674. 10.3389/fgene.2022.812674. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35126480/>
- Zhang Y., Li S., Li F., Lv C., Yang QK (2021). Una dieta rica en grasas altera la ferroptosis y promueve la invasividad del cáncer mediante la regulación negativa del supresor tumoral ACSL4 en el adenocarcinoma de pulmón. *Biol. Direct* 16 (1), 10. 10.1186/s13062-021-00294-7 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34053456/>
- ácidos grasos: ¿un oncogén metabólico en el cáncer de próstata? *J. Cell Biochem.* 91 (1), 47–53. 10.1002/jcb.10708, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34053456/>
- He, L. et al. Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 50, (2018). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111797/>
- <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/colon-cancer/diagnosis-treatment>

- Jiang, Y. et al. ADAMTS12 promotes oxaliplatin chemoresistance and angiogenesis in gastric cancer through VEGF upregulation. *Cell. Signal.* **111**, (2023). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37619822/>
- Li, H. et al. CPT2 downregulation triggers stemness and oxaliplatin resistance in colorectal cancer via activating the ROS/Wnt/ β -catenin-induced glycolytic metabolism. *Exp. Cell Res.* **409**, (2021). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34688609/>
- Maloberti P.M., et al. ACSL4, in *Encyclopedia of Signaling Molecules*, S. Choi, Editor. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 1-8 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27842070/>
- Murakami K, Routtenberg A. Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca²⁺. *FEBS Lett.* 1985;192(2):189-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934001/>
- Rahman, M. et al. Inhibition of COX-2 in colon cancer modulates tumor growth and MDR-1 expression to enhance tumor regression in therapy-refractory cancers in vivo. *Neoplasia* **14**, 624–633 (2012). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22904679/>
- Salim, H. et al. DKK1 is a potential novel mediator of cisplatin-refractoriness in non-small cell lung cancer cell lines. *BMC Cancer* **15**, 1–16 (2015). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26353782/>
- Seeger DR, Murphy CC, Murphy EJ. Astrocyte arachidonate and palmitate uptake and metabolism is differentially modulated by dibutyryl-cAMP treatment. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2016;110:16-26. doi:10.1016/j.plefa.2016.05.003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255639/>
- Takei, S., Kawazoe, A. & Shitara, K. The New Era of Immunotherapy in Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35205802/>
- Wada M, DeLong CJ, Hong YH, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem.* Published online 2007. doi:10.1074/jbc.M703169200 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17519235/>



Quintanilla
Gutierrez
Jedmita
32.610.613