



PAPEL DE COX-2 EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ELONGASAS Y DESATURASAS

Trabajo Final de Grado

Grado en Biotecnología

Curso académico 2014-2015

Autora: ***Marina Sánchez Petidier***

Tutora: ***Dña. María Adelaida García Gimeno***

Directora experimental: ***Dña. Marta Casado Pinna***



Valencia, Septiembre 2015

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

PAPEL DE COX-2 EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE ELONGASAS Y DESATURASAS

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) are the enzymes that catalyze the rate-limiting step in the synthesis of prostanoids. Prostaglandins play an important role in many biological processes such as platelet aggregation, maintenance of the gastric mucosa, reproduction, etc. And they play it in pathological processes such as inflammation and cancer also. COX-2 is expressed and induced by different stimuli in various tissues and cell types, but its expression in hepatocytes is limited to those pathophysiological situations leading to dedifferentiation, proliferation or cell regeneration. In the laboratory, we try to elucidate the role of COX-2 in this tissue by using animal and cell models. Genomic and metabolomic studies have been done, both in wild type and transgenic animals for *hCOX-2* gene, and have been analyzed at the same time to find gene expression changes that could justify the changes in metabolite levels. The aim of this Final Project consists in the study of the expression of genes related to COX-2 by using RNA obtained from the liver of transgenic animals overexpressing human COX-2 in their hepatocytes and by using immortalized liver cells from that tissue. Finally, a biological explanation for the results obtained, and based on previous literature, will be searched.

Keywords: COX-2, animal models, cell lines, gene expression

RESUMEN

Las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) son las enzimas que catalizan el paso limitante en la síntesis de prostanoideos. Las prostaglandinas juegan un papel importante en numerosos procesos biológicos como la agregación plaquetaria, mantenimiento de la mucosa gástrica, reproducción, etc. Y también en procesos patológicos como la inflamación y el cáncer. COX-2 se expresa y se induce por diferentes estímulos en diversos tejidos y tipos celulares, pero en el hepatocito su expresión está limitada a aquellas situaciones fisiopatológicas que conducen a dediferenciación, regeneración o proliferación celular. En el laboratorio, mediante modelos animales y celulares se intenta elucidar el papel de la COX-2 en este tejido. Se han llevado a cabo estudios genómicos y metabolómicos, tanto en animales con el gen silvestre como en aquellos que se les ha insertado el gen *hCOX-2*, que se han analizado conjuntamente para encontrar cambios de expresión génica que justifiquen los cambios en metabolitos. El objetivo del Trabajo Final de Grado consistirá en el estudio de la expresión de genes relacionados con COX-2 tanto a partir de RNA obtenido de hígado de animales transgénicos que sobreexpresan en el hepatocito la COX-2 humana como a partir de células hepáticas inmortalizadas a partir de dicho tejido. Finalmente, se buscará una explicación biológica a los resultados obtenidos apoyándose en bibliografía.

Palabras clave: COX-2, modelos animales, líneas celulares, expresión génica

Alumna: Dña. Marina Sánchez Petidier
Valencia, septiembre de 2015

Tutora Académica: Prof. Dña. María Adelaida García Gimeno

Cotutora: Dra. Dña. Marta Casado Pinna

AGRADECIMIENTOS

Dedicado a mi madre, por el infinito apoyo y cariño que siempre me ha brindado y por todos los sacrificios que ha realizado por mí.

A mi padre, por enseñarme que nada es imposible y que con esfuerzo se alcanzan todas las metas.

A Edgar, ese compañero con el que compartes apuntes, llamadas antes de los exámenes y dudas de última hora y que al final se convierte en un hermano para ti

A mi directora experimental Dña. Marta Casado, por abrirme las puertas de su laboratorio y ofrecerme la oportunidad de poner en práctica mi vocación.

*Y a Pablo, no hay palabras para describir lo mucho que me has aportado durante estos cuatro años, gracias por estar a mi lado.
Te quiero.*

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	2
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	CICLOOXIGENASAS	2
2.1.1.	Diferencias a nivel de expresión génica y de regulación de COX-1 y COX-2.	3
2.1.2.	Estructura y localización génica	3
2.1.3.	Características de las proteínas.....	4
2.2.	HÍGADO Y SU RELACIÓN CON COX-2	5
2.2.1.	Hígado	5
2.2.2.	COX-2 en el hígado	5
2.3.	SÍNTESIS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.....	6
2.3.1.	Lipógenesis de novo de ácidos grasos poliinsaturados.....	6
3.	OBJETIVO.....	9
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1.	REACTIVOS	10
4.2.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	10
4.2.1.	Hígado de ratón transgénico.....	10
4.2.2.	Cultivo celular.....	10
4.3.	EXTRACCIÓN DEL RNA.....	10
4.4.	RT	11
4.5.	PCR	11
4.6.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA	11
4.7.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PGE ₂	14
4.8.	DETERMINACIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVO	14
4.9.	INMUNOFLUORESCENCIA	15
4.10.	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	15
4.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR NCL.....	17
5.1.1.	<i>hCOX-2</i> PCR de comprobación	17
5.1.2.	Determinación de la actividad de COX-2.....	17
5.1.3.	Expresión de <i>hCOX-2</i>	18

5.1.4.	Inmunofluorescencia para la detección de <i>hCOX-2</i>	19
5.2.	ANÁLISIS DE DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN ENTRE TRANSGÉNICOS Y WILD TYPE	19
5.2.1.	Resultados de la metabolómica	19
5.2.2.	Elongasas	20
5.2.3.	Desaturasas	24
5.2.4.	Fosfolipasas	27
5.2.5.	Análisis de células tratadas con DFU	29
5.3.	COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE DATOS DE qPCR: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ VS PROGRAMA LinRegPCR	30
5.3.1.	Cómo calcula cada método el “dato cuantitativo” (Ct o N_0 según sea $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o LinRegPCR respectivamente) para analizar las diferencias entre las muestras.....	30
5.3.2.	Diferencias en el análisis de los datos	30
6.	CONCLUSIONES	32
7.	BIBLIOGRAFÍA	34

FIGURAS

Figura 1. *Producción de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.*

Figura 2. *Esquema de los promotores de COXs.*

Figura 3. *Esquema del transgén de DNA, *hCOX-2*, en el vector LIVhCOX-2.*

Figura 4. *Rutas de síntesis de Omega-6 y Omega-3.*

Figura 5. *Fundamento de las Sondas Taqman.*

Figura 6. *Comparación de los nucleótidos LNA con los de DNA y RNA.*

Figura 7. *Expresión del transgén *hCOX-2*.*

Figura 8. *Niveles de PGE_2 en las células NCL.*

Figura 9. *Diferencia de los niveles de PGE_2 en las células NCL-COX2 tratadas con DFU y sin tratar.*

Figura 10. *Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión *hCOX-2* en células NCL-V y NCL-COX2.*

Figura 11. *Determinación visual de *hCOX-2* en células NCL.*

Figura 12. *Ruta de biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y omega-6.*

Figura 13. *Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de *Elovl 5* en animales Wt y Tg.*

Figura 14. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Elov1 5 en células NCL-V y NCL-COX2.

Figura 15. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Elov1 6 en animales Wt y Tg.

Figura 16. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Scd 1 en animales Wt y Tg.

Figura 17. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Scd 2 en animales Wt y Tg.

Figura 18. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Fads 2 en animales Wt y Tg.

Figura 19. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Fads 2 en células NCL-V y NCL-COX2.

Figura 20. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Pla2g16 en animales Wt y Tg.

Figura 21. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Pld 1 en animales Wt y Tg.

Figura 22. Diferencias de expresión entre NCL- V y NCL-COX2 tratadas y sin tratar con DFU.

Figura 23. Representación de los niveles de expresión de COX-1 en las diferentes muestras de células NCL-V y NCL-COX2 tratadas o no con DFU.

Figura 24. Representación de los niveles de expresión de Elov1 5 en las diferentes muestras de células NCL-V y NCL-COX2.

TABLAS

Tabla 1. Información de los cebadores utilizados para la PCR.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la qPCR.

1. ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

cdNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

COX: Ciclooxygenasa

Ct: *Cycle Threshold*

DEPC: Dietilpirocarbonato

DFU: 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metil-sulfonil) fenil-2(5H)-furanona

DNA: Ácido desoxirribonucleico (en inglés)

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Elovl: Gen de Elongasa

Fads: Gen de Desaturasa de Ácidos Grasos

Gapdh: Gen de gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa

hCOX-2: Gen de COX-2 en humanos

Hprt: Gen de Hypoxantina fosforibosiltransferasa

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Prostaglandina

PGHS: Prostaglandina endoperoxido H sintasa

PI: Fosfolipasa

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados (en inglés, *Polyunsaturated fatty acid*)

QPCR: PCR cuantitativa

RNA: Ácido ribonucleico

RNasa: Enzima que degrada el RNA

RT: Retrotranscripción

Scd: Gen de la Esteroil-CoA Desaturasa

Tm: Temperatura melting

Tg: Transgénico

TX: Tromboxano

UPL: *Universal Probes Library* en inglés

Wt: Wild Type

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CICLOOXIGENASAS

La prostaglandina endoperoxido H sintasa (PGHS), también conocida como ciclooxigenasa (COX), cataliza la conversión del ácido araquidónico (AA) en prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TX), siendo este el paso limitante de la reacción (Smith y DeWitt, 1996). Han sido identificadas 3 isoformas de esta enzima, COX-1, COX-2 (Smith *et al.*, 1992) y COX-3 (Kis *et al.*, 2003). Aunque las más estudiadas en la fisiopatología son COX-1 y COX-2.

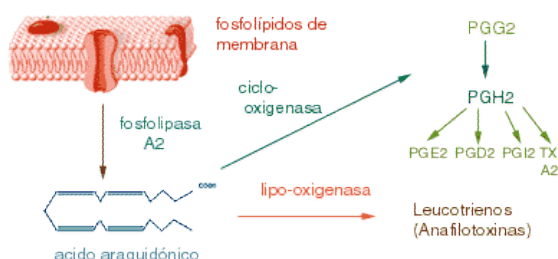


Figura 1. Producción de eicosanoides a partir del ácido araquidónico. Se indican las distintas vías para la producción de prostaglandinas y leucotrienos Fuente:

<http://med.javeriana.edu.co/Ciencias%20Fisiologicas/fw/c32.htm> (consultado en 6 de julio de 2015).

Ambas enzimas son bifuncionales y catalizan la misma reacción de no retorno, que es la ciclooxigenación del AA hasta los eicosanoides. (Samuelsson, 1963). La primera etapa de la reacción es la ciclación del AA para dar lugar a la prostaglandina G (PGG) gracias a la actividad ciclooxigenasa de la enzima y al aporte de dos moléculas de oxígeno. La PGG es una molécula inestable de vida corta que rápidamente se transforma en PGH₂ gracias a la actividad hidropoxigenasa. Esta PGH₂ es la precursora de todas las demás PGs y TXs por la acción de las enzimas prostaglandina sintasa y tromboxano sintasa específicas de tejido. (Chandrasekharan y Simmons, 2004).

Estas enzimas son importantes dianas terapéuticas de aspirinas y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Carty y Marfat, 1996; DeWitt, 1999). Por ejemplo, la aspirina actúa sobre la COX-1 para inhibir la formación de TXA₂ de plaquetas, reduciendo así, el riesgo en la mortalidad por enfermedad cardiovascular (Patrino, 1994). COX-2, en cambio, es la diana de los AINES que actúan inhibiendo procesos de inflamación, fiebre, dolor (Seibert *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995) y en algunos cánceres (Giovannucci *et al.*, 1995; Eberhart *et al.*, 1994; Kutchera *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2007). En el caso de cánceres, se ha conseguido asociar la carcinogénesis de colon con COX-2, incluso en modelos murinos se ha conseguido una supresión de la formación de esta clase de adenomas y poliposis mediante inhibidores selectivos de COX-2 (Oshima *et al.*, 1996; Sheng *et al.*, 1997; Dubois y Smalley, 1996; Eberhat *et al.*, 1994).

El conocimiento de las PGs data del año 1930, gracias a los estudios de los ginecólogos Raphael Kurrok y C. C. Lieb (1930) sobre la contractibilidad del músculo uterino en respuesta al

líquido seminal, causada por las PGs. En 1964 se describió la conversión de AA en PGs (Bergstroem *et al.*, 1964). Años más tarde, en 1971, se comenzó a sugerir que el principal mecanismo de acción de medicamentos como la aspirina era la inhibición de la biosíntesis de PGs (Vane, 1971). Pero no fue hasta años más tarde, en 1976, cuando se purificó la isoforma COX-1 a partir de vesículas seminales ovinas y bovinas (Hemler y Lands, 1976; Miyamoto *et al.*, 1976). Hasta principio de los noventa, se pensaba que esta era la única isoforma de la enzima, pero en 1991 se identificó la segunda isoforma, COX-2 (Kujubu, 1991). Finalmente en el año 2002, el grupo del Dr. Daniel Simmons (2002) describió la existencia de COX-3 como una nueva isoforma en la corteza cerebral canina.

2.1.1. Diferencias a nivel de expresión génica y de regulación de COX-1 y COX-2

COX-1 es conocida como la *isoenzima constitutiva*, ya que se encuentra en la mayoría de los tejidos incluyendo el sistema gastrointestinal (Morita, 2002; Smith y DeWitt, 1996). La actividad de esta isoforma ha sido asociada a la regulación de funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función de agregación plaquetaria (Patrono, 1994; DeWitt, 1983).

COX-2 es conocida como la *isoenzima inducible*, puesto que en la mayoría de tejidos es casi indetectable en condiciones normales pero fácilmente inducible en respuesta a factores de crecimiento, promotores tumorigénicos, hormonas, endotoxinas bacterianas, citoquinas (Lee *et al.*, 1992; Maier *et al.*, 1990;), óxido nítrico o mediadores de la inflamación tales como IL-1, TNF α o LPS (Hirata *et al.*, 1987; Salvemini D, 1997). Además, regula la producción de prostanoïdes en procesos de inflamación y procesos patológicos (Morita *et al.*, 1995; Balsinde *et al.*, 1998).

No obstante, estos adjetivos (constitutiva e inducible) no son del todo ciertos.

- COX-1 cambia sus niveles de expresión durante el desarrollo (Brannon *et al.*, 1994). Además, puede disminuir sus niveles de expresión en células endoteliales en respuesta a factores de crecimiento de fibroblastos y se sobreexpresa en mastocitos tratados con factores de células madre con dexametasona (Hla y Maciag, 1991).
- COX-2 se sabe que está constitutivamente expresada en testículos (Simmons *et al.*, 1991), el epitelio traqueal, en la mácula densa del riñón (Zhang *et al.*, 1997) y en el cerebro (Yamagata *et al.*, 1993).

2.1.2. Estructura y localización génica

El gen de la COX-1 se encuentra en el cromosoma 9, 9q32 - q33.3, en humanos. Está formado por 11 exones y 10 intrones y comprende unas 22 Kb de DNA genómico. Su mRNA transcrito es de 2.8 Kb (Hla y Neilson, 1992; Yokoyama y Tanabe, 1989).

El gen de la COX-2 se encuentra en el cromosoma 1 de humanos, 1q25.2 - q25.3. Se compone de 9 intrones y 10 exones que representan 8Kb de DNA genómico. Su transcripción origina tres variantes de mRNA de 4.6, 4.0 y 2.8 Kb. (Jones *et al.*, 1993).

El promotor de COX-1 muestra las características típicas de genes implicados en las funciones de mantenimiento del organismo en condiciones basales (*housekeeping* en inglés). Por ello no posee caja TATA ni caja CAAT. Mientras que el promotor de COX-2 posee múltiples lugares que controlan su expresión a nivel transcripcional. Entre ellos se encuentran elementos reguladores de transcripción como una caja TATA, una E-box, un motivo Cre en respuesta a cAMP, NF-κB, AP-1, proteína de unión a *enhancer* CAAT o elemento de respuesta a receptores activados por proliferador de peroxisomas (Tanabe y Tohna, 2002). Además, su transcripción puede ser controlada por acetilaciones o metilaciones (Yue *et al.*, 2011).

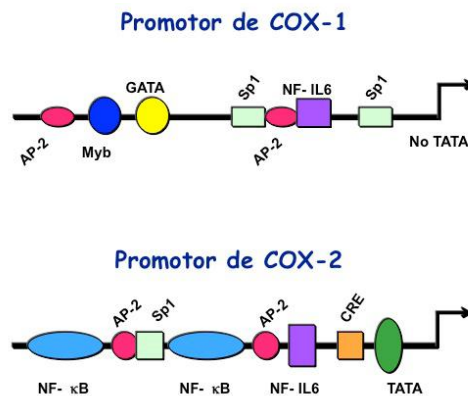


Figura 2. Esquema de los promotores de COXs. Se pueden observar las diferencias en los elementos de transcripción, como la ausencia de la caja TATA en COX-1. Fuente: Álvarez, M.S., 2014.

2.1.3. Características de las proteínas

Ambas proteínas se encuentran localizadas en la cara luminal del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear, estando fundamentalmente COX-2 en la región perinuclear y la membrana nuclear y COX-1 tanto en el citoplasma como cerca del retículo endoplásmico. (Spencer *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1995; Crofforf, 1997). Ambas comparten un 60% de homología en su estructura primaria (Kurumbail *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2006) y tienen características enzimáticas muy similares. Son enzimas homodiméricas de 70 a 74 kDa de masa molecular y de unos 600 aminoácidos.

Cada proteína está organizada en cuatro dominios estructurales (Simmons *et al.*, 2004):

- Péptido señal. Situado en el amino terminal, va a dirigir a la proteína a su localización final. En COX-1 mide de 22 a 26 aminoácidos y en COX-2 mide 17 aminoácidos, teniendo el de COX-1 mayor hidrofobicidad que le permite una translocación más temprana a la membrana.
- Dominio de dimerización. Es un dominio tipo EGF de 50 aminoácidos de longitud, que tiene residuos capaces de formar puentes disulfuro, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas.
- Dominio de unión a la membrana. Es un dominio tipo MBD formado por 4 hélices α anfipáticas que une la proteína a la cara luminal de la bicapa lipídica.
- Dominio catalítico. Se encuentra en el extremo carboxi terminal y presenta 2 sitios catalíticos, uno con la actividad peroxidasa, coordinada con un grupo hemo, y otro con actividad ciclooxygenasa. Ambos sitios están funcional y físicamente separados.

En COX-1 el sitio de unión a sustrato e inhibidores es un residuo de arginina en la posición 120 del sitio con actividad ciclooxigenasa, mientras que para COX-2 este sitio no es esencial para su inhibición (Rieke *et al.*, 1999).

Además el sitio activo de COX-1 es más pequeño que el de COX-2 ya que los residuos del sitio activo de COX-1 son más grandes y ocupan más espacio que en COX-2. En COX-1 hay una isoleucina en el residuo 523, mientras que el COX-2 es una valina. Esto va a permitir una mayor apertura del sitio de COX-2 y que sea más accesible a los AINES (Kurumbail *et al.*, 1996).

2.2. HÍGADO Y SU RELACIÓN CON COX-2

2.2.1. Hígado

El hígado es el órgano glandular más grande del cuerpo. Es una víscera fundamental que interviene en funciones vitales tanto sintetizar proteínas, como regular producción de compuestos y eliminar sustancias tóxicas. En el hígado, los azúcares, aminoácidos y lípidos serán sometidos a diferentes procesos para ser posteriormente distribuidos a través de la sangre a los diferentes órganos (Garrido y Teijón, 2003).

Se compone de células del parénquima y células del estroma. Las células parenquimáticas, los hepatocitos, representan un 80% de las células hepáticas y son las encargadas de realizar las funciones mencionadas anteriormente. El 20% restante se corresponden a las células del estroma que se compone de células de Kupffer, células endoteliales, células epiteliales biliares, células de Ito, células estrelladas y células natural killer.

2.2.2. COX-2 en el hígado

Los hepatocitos adultos no tienen la capacidad de expresar COX-2, sin embargo, las células de Kupffer, células estrelladas, hepatocitos fetales y células de ratón inmortalizadas conservan la capacidad de expresar COX-2 tras su estimulación mediante factores proinflamatorios como lipopolisacáridos o citoquinas (Martin-Sanz *et al.*, 1998; Ledwith, 1997). Se ha comprobado que en hepatectomías parciales, COX-2 se induce, y ésta contribuye a la progresión del ciclo celular (Casado *et al.*, 2001; Fernandez-Martinez *et al.*, 2004). Además, su expresión ha sido detectada en modelos humanos y animales en enfermedades como la cirrosis (Yamamoto *et al.*, 2003), tras infección del virus de la hepatitis B y C (Lara-Pezzi *et al.*, 2002; Nuñez *et al.*, 2004), en líneas celulares de hepatoma (Kern *et al.*, 2002) y en carcinoma hepatocelular (Morinaga *et al.*, 2002). La sobreexpresión de COX-2, ha sido también asociada directamente a carcinogénesis hepatobiliar, mostrándose, en estudios *in vitro*, como los inhibidores de COX-2 reducen el crecimiento de células carcinogénicas (Hu, 2003).

En estas condiciones inflamatorias crónicas, los hepatocitos expresan COX-2, por lo que la investigación de patologías hepáticas tiene una gran relación con la investigación de dicha enzima.

Para la realización de este trabajo se generaron ratones transgénicos (Tg) que llevaban incorporado la isoforma humana de la COX-2 (*hCOX-2*), bajo el control del promotor hepático humano ApoE y con la adición de un locus (HCR) para su expresión exclusiva en hepatocito según el protocolo establecido por Casado *et al.*, (2007).

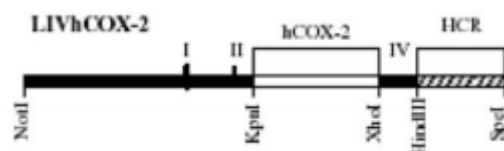


Figura 3. Esquema del transgén de DNA, hCOX-2, en el vector LIVhCOX-2. Se observa el locus HCR que permite la expresión exclusiva en hepatocitos. Fuente: Casado *et al.*, (2007).

Estos animales Tg no presentaban diferencias fenotípicas con sus compañeros Wild Type (Wt). Además no mostraron cambios histológicos detectables en hígado ni cambios a nivel macroscópico del órgano. No obstante la actividad funcional de COX-2 en Tg se comprobó por medición de niveles de prostaglandinas, que mostraron un aumento significativo (Casado *et al.*, 2007).

2.3. SÍNTESIS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

El AA o ácido eicosatetraenoico es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces cis en las posiciones 5, 8, 11 y 14 [20:4(5,8,11,14)].

El AA es el sustrato de lipooxigenasas y ciclooxigenasas. La ruta oxidativa lipooxigenasa da lugar como productos principales a leucotrienos, HETE y lipoxinas. Mientras que la vía de las ciclooxigenasas da lugar a PGs, prostaciclina y TXs.

El AA es uno de los constituyentes básicos de las membranas celulares. En ellas, se encuentra esterificado en la posición 2 de los fosfolípidos, aunque también se encuentra en una pequeña proporción en los ésteres y en los triglicéridos (Amanda *et al.*, 1979).

Existe una cantidad muy baja de AA libre a nivel intracelular, por ello se libera al medio gracias a la acción enzimática de las fosfolipasas, siendo las más importantes las A₂ y las C. Esta reacción hidroliza la unión éster en posición 2 del AA para su liberación. La activación de esta enzima viene dada por estímulos tanto específicos (fisiológicos hormonales o proteicos), como inespecíficos, que se producen en condiciones patológicas (como en un daño mecánico o una isquemia) (Companioni, 1995; Smith, 1992).

2.3.1. Lipógenesis de novo de ácidos grasos poliinsaturados

Al ser un ácido graso poliinsaturado (PUFA en inglés), el AA, puede ser sintetizado de *novo* a partir de ácidos grasos esenciales. El principal órgano metabólico responsable de la síntesis y liberación de los ácidos grasos es el hígado en un proceso llamado lipogénesis de *novo* (Leonhardt y Langhans, 2004).

La síntesis de PUFAs es llevada a cabo por elongasas y desaturasas de los ácidos grasos (Sprecher, 2000). Estas enzimas transforman los ácidos grasos esenciales, tales como el ácido linoleico (18:2, n-6) o el ácido α -linolénico (18:3, n-3) en productos de las rutas omega-6 y omega-3, respectivamente.

El ser humano no puede sintetizar estos ácidos grasos esenciales, por lo que deben ser ingeridos por la dieta. El ácido linoleico es el precursor inmediato de la dieta del AA. Se encuentra en alimentos como la soja, semillas de lino, pipas de calabaza o girasol, y en aceites como el de girasol, onagra y maíz (Simopoulos *et al.*, 1999).

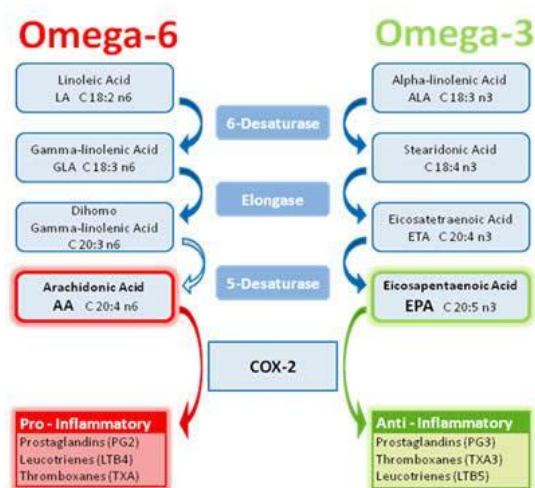


Figura 4. Rutas de síntesis de Omega-6 y Omega-3. Indica los metabolitos implicados en las rutas así como las enzimas que llevan a cabo transformaciones de unos a otros. Fuente: <http://fuelyourhealth.net/tag/omega-6> (consultado el 6 de julio de 2015).

Como se observa en la Figura 4, en la vía de los n-6 PUFA (Omega-6) para sintetizar el AA intervienen, en primer lugar, la $\Delta 6$ -desaturasa para convertir el ácido linoleico en ácido γ -linolénico que dará lugar al ácido dihomo- γ -linolénico gracias a una elongasa, concretamente la 5. Finalmente, la $\Delta 5$ -desaturasa transformará este ácido en el AA. Este es el resultado de procesos de elongación y desaturación que tienen lugar en las mitocondrias y retículo endoplasmático.

Las enzimas que intervienen en estas rutas son importantes reguladores de la expresión génica hepática y la composición de lípidos (Wang *et al.*, 2006).

2.3.1.1. Elongación

La elongación de ácidos grasos representa la principal ruta para la determinación de la longitud de las cadenas monoinsaturadas y poliinsaturadas de estos ácidos. La reacción global para la elongación de ácidos grasos comprende cuatro enzimas y utiliza malonil CoA, NADPH, y acil CoA como sustratos.

Existen 2 tipos de elongaciones:

- **La elongación mitocondrial.** Es la inversa de la oxidación de ácidos grasos. Utiliza acetil-CoA, enoil-CoA y acil-CoA como sustratos y extiende la longitud de cadena en dos carbonos. Este proceso actúa principalmente sobre ácidos grasos con una cadena hidrocarbonada con menos de 16 carbonos. (Cook, 1985).
- **La elongación en el retículo endoplásmico (en microsomas).** Esta elongación está presente en las plantas, mamíferos, levaduras y otros eucariotas inferiores. Esta elongación suele ocurrir en ácidos grasos de 16 carbonos en adelante (Cinti *et al.*, 1992).

La elongación tiene 4 etapas (Garrido y Teijón, 2003):

1. Condensación de grupos acetyl-CoA con el malonil-CoA, ambos presentes en los orgánulos nombrados, dando lugar al malonil-S-CoA, con 2 carbonos adicionales, catalizada por β -cetoacil-CoA sintasa.
2. Reducción que requiere a NADPH como co-factor, catalizada por β -cetoacil-CoA reductasa.
3. Deshidratación, catalizada por β -hidroxiacil-CoA deshidratasa.
4. Otra reducción similar a la anterior, catalizada por trans-2-enoil-CoA reductasa.

Existen 7 tipos de elongasas caracterizadas en mamíferos, llamadas Elovl por su nombre en inglés *elongation of very long chain fatty acids* (Leonard *et al.*, 2004). De los siete subtipos de elongasas de ácidos grasos identificados en los genomas de ratón y humano, cinco subtipos se expresan en hígado tanto de humano como de roedor: Elovl 1, Elovl 2 (Tvrdik *et al.*, 2000), Elovl 3 (Tvrdik *et al.*, 1997), Elovl 5 (Leonard *et al.*, 2000) y Elovl 6 (Moon *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Desaturación

La desaturación es el proceso que introduce la insaturación en el ácido graso empleando O_2 y NADP. Estas enzimas introducen las insaturaciones en los carbonos 5, 6 ó 9, de ahí sus nombres, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 6$ -desaturasa y $\Delta 9$ -desaturasa. Como no pueden introducir insaturaciones más allá del C9, no podemos sintetizar ácido linoleico (18:2 $\Delta 9,12$) o ácido α -linolénico (18:3 $\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$).

La desaturasas son conocidas como Scd (del inglés, *Stearoyl-CoA desaturase*). En ratones se han identificado 4 isoformas Scd (1, 2, 3 y 4), pero en humanos sólo se han descrito 2 isoformas, Scd 1 y Scd 5 (Shanklin y Somerville, 1991). Scd 1 humana presenta una homología del 85% en la secuencia de aminoácidos con las 4 isoformas de ratón. Sin embargo Scd 5 no presenta una gran homología con las Scd de roedores.

Cuando hablamos de desaturasas específicas de ácidos grasos, algunas Scd toman el nombre de Fads (del inglés, *Fatty Acid Desaturase*). En humanos existen Fads 1 y Fads 2, que son las Scd 5 y D6D (*Delta (6) fatty acid desaturase*) respectivamente (Marquardt *et al.*, 2000).

3. OBJETIVO

El objetivo de nuestro grupo de trabajo es conocer el papel de COX-2 en el hígado y caracterizar modelos animales y celulares que permitan su estudio. Para ello se han realizado análisis de genómica, metabolómica y proteómica tanto en tejido de animales Wt como de animales Tg. Con los estudios genómicos, mediante microarrays, se obtuvieron 155 genes *upregulated* y 170 *downregulated*, considerando como positivos aquellos genes que presentaban diferencias iguales o superiores a 2 con respecto a los Wt. Con los estudios metabolómicos, se analizaron diferentes metabolitos en dos grupos de 10 ratones Tg y 10 ratones Wt para observar las diferencias que había entre uno y otro.

Los genes obtenidos en los experimentos de microarrays deben ser validados por otras plataformas, en nuestro caso la PCR cuantitativa (qPCR), ya que existe un alto porcentaje de falsos positivos en este tipo de plataforma masiva de cuantificación.

Observando los datos del estudio genómico, y basándonos en las diferencias encontradas en el estudio metabolómico, se seleccionaron unos genes en concreto que se desean validar por qPCR.

Así pues los objetivos de este trabajo son:

- Validar los genes seleccionados mediante la qPCR, basándonos en los estudios previos desarrollados por el grupo de trabajo.
- Buscar una explicación biológica de los resultados obtenidos con ayuda de bibliografía.
- Caracterización de la línea celular NCL utilizada para los experimentos de qPCR.
- Comparar dos métodos distintos de análisis de datos de qPCR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo han sido suministrados por Arbor Assays (Ann Arbor, MI, USA), Biotium (Hayward, CA, USA), BD Biosciences (MA, EEUU), BioRad (CA, USA), Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Promega (Madison, WI, USA), Santa Cruz Laboratories (Santa Cruz, CA, USA), Scharlau (BCN, ES), Sigma (St. Louis, MO, USA) y Roche Diagnostics (Mannheim, Germany), Lonza (LONN, Swiss), Biotool (AG, Swiss) y CAYMAN (Ann Arbor, MI, USA).

4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1. Hígado de ratón transgénico

Para la realización de este trabajo se utilizaron hígados congelados en nitrógeno líquido de 30 ratones, 15 de ellos Tg y 15 Wt. Los ratones Tg y Wt fueron generados, criados y sacrificados en el IBV-CSIC. Los ratones transgénicos llevaban incorporado un transgén que contenía DNA del gen *hCOX-2* bajo el control de un promotor hepático. 20 de los 30 hígados totales, 10 Tg y 10 Wt, fueron utilizados previamente en un estudio metabólico realizado por OWL Metabolomics, en el Parque Tecnológico de Bizkaia.

4.2.2. Cultivo celular

Se utilizaron células de hígado de ratón inmortalizadas por el método del antígeno T de SV40 (Lane y Crawford, 1979), línea celular NCL. Estas células fueron generadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” en Madrid a partir de hígado de ratones Tg y Wt. Las células que partían del hígado transgénico se denominaron NCL-COX2, por llevar insertado el transgén, y las que partían del Wt, NCL-V, ya que el hígado de partida había sido transfectado con un vector vacío. Las células se cultivaron en frascos T75, con 75 cm² de superficie, previamente extraídas del stock y pasadas a un T25. El medio utilizado para su crecimiento fue el DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium), suplementado con 5mL/L de estreptomina/penicilina, 5 mL/L de L-glutamina y un 10% de suero fetal bovino inactivado (media hora a 55°C). Todos los componentes del medio completo son de Lonza. Las células fueron cultivadas a 37°C, en atmósfera humificada con 5% de CO₂. Los pases se realizaron cada 2-3 días, con diluciones 1:6, cuando las células llegaban al 80% de confluencia. Si se esperaba a que llegaran a la confluencia total, la tripsinización no era eficiente y el metabolismo celular se ralentizaba.

4.3. EXTRACCIÓN DEL RNA

El RNA, tanto de las células como de los tejidos, se aisló utilizando TRI Reagent Solution (Applied Biosystems, Life Technologies) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. TRI Reagent Solution combina fenol y tiocianato de guanidina en una solución monofásica para inhibir rápidamente la actividad de RNasas. Las muestras biológicas son homogeneizadas o lisadas en la solución de TRI Reagent. El homogeneizado resultante se separa en fase acuosa y orgánica mediante la adición de cloroformo y centrifugación. El RNA se queda en la fase acuosa, el DNA a la interfase, y las proteínas a la fase orgánica. A continuación, se precipita el RNA de la fase acuosa con isopropanol, y finalmente se lava con etanol y se diluye en agua DEPC libre de RNasas.

Para cuantificar y asegurar la integridad del RNA obtenido se realizó un análisis de espectrofotometría utilizando un biofotómetro que nos indicaba la cantidad de RNA de la que disponíamos, así como la calidad del mismo mediante la relación de absorbancia 260/280. Además se analizó mediante una electroforesis horizontal con un gel de agarosa 1% a 100mV y tinción Gel Red.

4.4. RT

La síntesis de cDNA fue llevada a cabo mediante un kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) a partir de 1µg de RNA. El procedimiento utilizado en la RT consiste en dos pasos, explicados en el protocolo adjunto del fabricante. El primer paso es la preparación de RNA que es sometido a una desnaturalización a 65°C durante 10 minutos junto con 2 µL de hexámeros cebadores de secuencia aleatoria con concentración final de 60µM y agua libre de RNAsas hasta llegar a 13 µL. Tras este paso se añaden 4 µL de la Reacción Buffer de la Transcriptasa Reversa a concentración final de 1X (que incluye 8mM de MgCl₂), 0.5 µL de inhibidor de RNAsas 20 U, 2 µL Mix de dNTP 1mM y 0.5 µL de Transcriptasa Reversa con una concentración de 10 U. Este último paso consiste en una incubación de 10 min a 25°C seguido de 1 hora a 50°C y, para inactivar la enzima, 5 minutos a 85°C.

4.5. PCR

Con la PCR amplificamos el fragmento de *hCOX-2* para confirmar la expresión del transgén y que no había contaminación entre las muestras y el control.

Las condiciones de la PCR fueron de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, y una fase de elongación final de 10 minutos a 72°C.

La mezcla de reacción de la PCR contenía: 2 µL de cDNA, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de oligonucleótidos directo y reverso, 1,5 mM Mg²⁺, 2,5 U de DNA Taq Man (Promega), en 20 µl de volumen final conteniendo tampón de reacción 1X. La secuencia de los cebadores utilizados se especifica en la Tabla 1:

Tabla 1. Información de los cebadores utilizados para la PCR.

Cebador	Long.	Tm	%GC	Secuencia
<i>hCox-2</i> fusion Forward	30	>75°C	80	5'-GCGGCCCTCGAGATGCTCGCCCGCCCTG-3'
Cox/transg-seq Reverse	19	54.5°C	47.4	5'-GCATTGTAAGTTGGTGGAC-3'

Esta amplificación fue comprobada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% a 100 mV y posteriormente se tiñó con gel de tinción de ácidos nucleicos Gel Red.

4.6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN POR PCR CUANTITATIVA

La qPCR es una variante de la PCR convencional que se utiliza para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación de DNA o cDNA, obtenido por una retrotranscripción a partir de RNA. Utiliza los mismos reactivos

que una PCR convencional (cebadores específicos, dNTPs, un buffer de reacción y una DNA Polimerasa termoestable), pero además, a esta mezcla se le adiciona una sonda que incluye un fluoróforo para que el termociclador pueda medir la fluorescencia, que es directamente proporcional a la cantidad de producto (amplicón) obtenido en cada ciclo de amplificación. De esta manera, podemos cuantificar a tiempo real la cantidad de producto que tenemos. Por este motivo la qPCR se ha convertido en un procedimiento bien establecido para la cuantificación absoluta o relativa de los niveles de expresión de genes, que es nuestro objetivo final.

En el trabajo se llevaron a cabo dos qPCR utilizando métodos distintos, aunque ambas utilizan el mismo fundamento de detección y optimización:

El primer método consiste en utilizar **sondas Taqman**. Éstas permiten la detección del producto de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos. Esta sonda posee un primer fluoróforo en el extremo 3', el cual se llama Reporter, y en el otro extremo 5' se encuentra el Quencher, que bloquea la emisión de fluorescencia por parte del otro fluoróforo. Este tipo de sondas reconocen específicamente el fragmento de DNA que amplifican los cebadores, de modo que cuando la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq Polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza liberando al Reporter del Quencher y permite la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo. La fluorescencia está relacionada, como se ha mencionado antes, con la cantidad de amplicón producido.

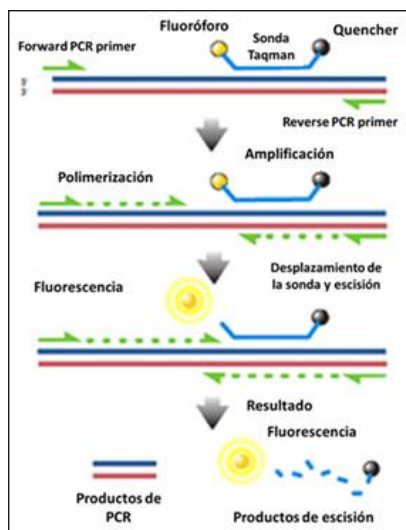


Figura 5. Fundamento de las Sondas Taqman. Se observa los diferentes sucesos que ocurren en cada etapa de la qPCR, siendo importante que durante la amplificación se hidroliza la sonda por la Polimerasa y se libera la fluorescencia. Fuente: <http://epidemiologiamolecular.com/estudio-virolgico-virus-gripe/> (consultado el 18 de julio de 2015).

Con este método analizamos el nivel de expresión de los genes de las distintas isoformas de COX, COX-1 y COX-2. Como control endógeno para posteriormente poder normalizar los datos obtenidos, se utilizó el gen *Gapdh*.

Para llevar a cabo la qPCR se utilizaron 3 µl de cDNA diluido 1:5 de la RT con 1 µl de Buffer de reacción 1X que contenía las sondas y cebadores de cada gen, con 10µL 1X de la enzima Taq Polimerasa y agua hasta llegar a los 20 µL finales. Tanto los buffers de reacción, como la enzima, fueron obtenidos de Assays-on-demands gen expression product (Life Technologies). La reacción comprende un paso a 95°C de 20 segundos de duración, seguido de 40 ciclos de un paso a 95°C durante 3 segundos seguido de 30 segundos a 60°C.

El segundo método consiste en utilizar **Universal Probe Library (UPL)**. Las UPL son similares a las sondas Taqman, ya que llevan un fluoróforo en el extremo 3' y un Quencher en el extremo 5' que bloquea su fluorescencia hasta que son separados por la actividad exonucleasa de la Taq Polimerasa (Figura 5). En este caso las sondas tienen una gran cobertura de transcritos debido a su corta longitud (entre 8 y 9 nucleótidos), ya que poseen nucleótidos LNA, ácidos nucleicos bloqueados (Figura 6), lo que les permite mantener la especificidad y la temperatura de melting (Tm) que necesitan. Además proporcionan un incremento en la termoestabilidad y presentan un gran poder de discriminación frente a la generación de dúplex. Los nucleótidos LNA son análogos de los nucleótidos de DNA con la diferencia de un aumento en la robustez de las uniones si la comparamos con la de los nucleótidos de ADN estándar.

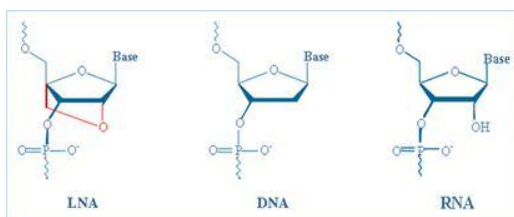


Figura 6. Comparación de los nucleótidos LNA con los de DNA y RNA. En LNA enlace éster que no está presente en DNA y RNA, permite el bloqueo. Fuente: https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/Product2_15006_10001_68068 (consultado el 18 de julio de 2015).

Este método es similar al descrito anteriormente ya que la cantidad del DNA también es proporcional a la fluorescencia observada tras la hidrólisis de la sonda.

Mediante este método se analizó la expresión de las elongasas, *Elovl 5* y *Elovl 6*, las desaturasas, *Scd 1*, *Scd 2* y *Fads 2*, y las fosfolipasas, *Pld 1* y *Pla2g16*; como control endógeno *Hprt*. Las secuencias de los cebadores utilizados se describen en la Tabla 2:

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la qPCR.

Gen	Cebador	Longitud	Sonda UPL	Tm	%GC	Secuencia
<i>Hprt</i>	Forward	19	#95	56.4	52.6	5'TCCTCCTCAgACCgCTTTT
	Reverse	21		54.5	47.6	5'CCTggTTCATCATCgCTAATC
<i>Elovl 5</i>	Forward	18	#31	56.2	61.1	5'gTCCTCCATCCCgTCCAT
	Reverse	21		54.8	42.9	5'CTggATgATTgTCAgCACAAA
<i>Elovl 6</i>	Forward	20	#52	55.2	50	5'gCATTcATTTcCTCCTACgg
	Reverse	21		56.8	57.1	5'gAgTCgCTACgTgTTCTCTgC
<i>Scd 1</i>	Forward	19	#82	56.5	57.9	5'gACCTgAAAgCCgAgAAgC
	Reverse	20		54.8	50	5'gATgAAgCACATCAgCAggA
<i>Scd 2</i>	Forward	18	#89	56.1	61.1	5'CTCATCCCTgggAACgTg
	Reverse	20		56.3	55	5'gCTgAgTAAgCgCCAgAgAT
<i>Fads 2</i>	Forward	21	#60	55	42.9	5'AATTTCCAgATTgAgCACCAC
	Reverse	19		56.4	57.9	5'gCgCAgAgAgACTTCACCA
<i>Pld 1</i>	Forward	23	#60	56.1	39.1	5'TTgCTgACgACAACAgTTATT
	Reverse	20		55.1	50	5'gCACTATgACAgCCATTTcG
<i>Pla2g16</i>	Forward	21	#80	56	42.9	5'TggAAAATgCTAgCACCCATA
	Reverse	20		55.4	45	5'CATAgggCggAAAATCTCAA

Para llevar a cabo la qPCR se utilizaron 3 μ l de cDNA diluido 1:5 de la RT con 10 μ l del Buffer de reacción EagleTaq ROX que contiene la polimerasa, 1 μ l de cada primer con una concentración final de 0.5 μ M, 0.4 μ l de la sonda UPL correspondiente a cada gen con una concentración final de 0.2 μ M y agua hasta llegar a un volumen final de 20 μ l. La reacción comprende un primer paso a 95°C de 10 minutos de duración, seguido de 45 ciclos de un paso a 95°C durante 15 segundos seguido de 1 minuto a 60°C. Las sondas UPL utilizadas son de TIB Molbiol (ROCHE).

Ambas qPCR se realizaron en placas MicroAmp de 96 pocillos (Applied Biosystems) que se introdujeron en el termociclador 7500 Fast Real time PCR System de Applied Biosystem utilizando el programa Fast.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PGE₂

La concentración de PGE₂ producida por hCOX2 fue determinada mediante un kit comercial de Arbor Assays, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

El kit consiste en un ELISA de competición entre las PGE₂ de las muestras y una enzima conjugada, la PGE₂-peroxidasa. En los pocillos de las placas donde ocurre la reacción, se añaden anticuerpos monoclonales específicos de PGE₂ que se unirán a los anticuerpos policlonales que recubren el fondo de los pocillos. Una vez unidos la enzima y las PGE₂ a los anticuerpos, se añade el sustrato de la enzima y tras una incubación de media hora se mide la intensidad del color del producto de la reacción en un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad es directamente proporcional a la cantidad de enzima que hay en cada pocillo e inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ de las muestras. Gracias a la realización de la curva estándar con el estándar de PGE₂, que viene con el kit, podemos cuantificar la cantidad de PGE₂ de cada muestra.

4.8. DETERMINACIÓN DE MICOPLASMAS EN CULTIVO

Los micoplasmas son los procariontes más pequeños y simples que existen. Son una de las fuentes más comunes de contaminación de cultivos celulares. Cuando se contamina un cultivo con micoplasmas, a menudo disminuye el crecimiento de las células debido a que éstos degradan los componentes del medio y modifican el metabolismo celular. Por ello es importante testar periódicamente los cultivos ante estos organismos.

Para poder determinar si los cultivos estaban contaminados con micoplasmas, se utilizaron dos kits de casas comerciales distintas para corroborar la validez de los resultados.

El primer kit utilizado fue el MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, de LONZA. Éste es un test bioquímico que explota la actividad de las enzimas de los micoplasmas. Con la adición del sustrato de la reacción, los micoplasmas se lisan y las enzimas liberadas reaccionan con el sustrato catalizando la conversión de ADP en ATP. Se mide la concentración de ATP, con un espectrofotómetro, antes y después de haber añadido el sustrato, y el ratio entre la segunda medición y la primera nos indica si hay contaminación o no, indicando un ratio >1 como contaminado y < 1 no contaminado en la mayoría de cultivos.

El segundo kit, Mycoplasma Detection Kit-QuickTest de BIOTOOL, detecta los productos metabólicos secretados específicamente por los micoplasmas al degradar el medio de cultivo.

Si la muestra contiene dichos metabolitos los pocillos donde ocurre la reacción cambian de color al añadirle el tampón de reacción. Comparando el color de las muestras con el del control positivo y negativo (medio de cultivo sin muestra), sabemos si el cultivo está contaminado o no.

4.9. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células NCL se crecieron en un portaobjetos multipocillo para cultivo celular (BD Biosciences), concretamente 40000 células/pocillo. Una vez habían crecido y estaban adheridas a la placa, se retiró el medio, se lavó con PBS 1x y se fijó con PFA al 4% durante 10 minutos en oscuridad. Tras este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y se permeabilizó con Triton al 0.2%, a partir de Triton 100x en PBS 1x, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS 1x, se llevó a cabo el bloqueo utilizando *superbloqueo* durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se dejaron toda la noche incubando a 4°C con el anticuerpo primario, COX-2 Monoclonal (#160112, Cayman) dilución 1:100 en la solución de *superbloqueo*.

Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS 1x y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Fluoresceína (#F-2761, Molecular Probes), dilución 1:1000. Después de la incubación, se lavaron otras 3 veces más con PBS 1x y se llevó a cabo la tinción de DNA para la visualización de los núcleos incubando en oscuridad 10 minutos con Hoechst (Life Technologies) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Finalmente, lavamos 3 veces con PBS 1x y colocamos un cubre encima del portaobjetos donde se encuentran las células. Previamente a la colocación del cubre, se pusieron unas gotas de Aqua Poly/Mount (#18606, Polysciences, Inc.) que evita que la fluorescencia se pierda y ayuda a pegar el cubre al portaobjetos.

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal de fluorescencia, el microscopio Leica SP8 con un objetivo de 63x INM oil (de inmersión en aceite) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

El PFA al 4% (para 50 mL) se prepara con 2g de para-formaldehído, 40 mL de agua y 125 μ L de NaOH 1M. Calentamos con cuidado hasta que se disuelva y añadimos 5 mL de PBS 10x y completamos con agua hasta los 50 mL.

El *superbloqueo* se prepara con un 10% de suero fetal bovino, 5% de leche de bloqueo, 0.5% de albumina sérica bovina, 0.1% de Triton 0.2% y se completa con PBS 1x.

4.10. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos en las qPCR han sido analizados por dos métodos distintos:

➤ $2^{-\Delta\Delta Ct}$

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utiliza los Ct (Cycle Threshold), que corresponden al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo, para el análisis de datos. Se compara los Ct del gen o de los genes de la muestra con los Ct del control (*housekeeping*), en nuestro caso *Gapdh* y *Hprt*.

Para ello se calcula el $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen control}) - (Ct \text{ medio gen interés} - Ct \text{ medio gen control})$$

Una vez calculado el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, podemos determinar el incremento o disminución de la expresión de los genes, teniendo en cuenta que el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las muestras control siempre es 1.

Para el diseño y la evaluación de un experimento como este, debemos tener en cuenta una buena elección del gen control, validarlo y disponer de la cantidad adecuada de cDNA para realizarlo (Livak y Schmittgen, 2001).

➤ Programa LinReg PCR

LinRegPCR es un programa de libre acceso para el análisis de los datos de qPCR. Este método se basa en los procedimientos descritos en Ruijter *et al.* (2009).

Los archivos que se importan al programa no deben tener la línea base corregida, puesto que el mismo programa la realiza en cada amplicón por separado. Después de esto determina una ventana de linealidad (*Window-of-Linearity*) y mediante una regresión lineal determina la eficiencia de la PCR (EPCR) de cada muestra gracias a la pendiente de la recta de regresión.

Con la EPCR y el valor Cq, también conocido como Cp o Ct (número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de cuantificación), podemos calcular la concentración de partida de cada muestra, expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia, gracias a la ecuación básica de la cinética de la PCR a partir del Cq:

$$N_c = N_0 \times E^c$$

Donde N_c es la media del amplicón tras C ciclos; N_0 es la concentración inicial del amplicón; y E es la eficiencia de la amplificación.

Esto es posible porque el valor Cq marca la posición de la curva de amplificación en el eje de abscisa, que indica el número de ciclo, y es proporcional al logaritmo de la concentración inicial de la muestra (Livak, 1997; Witwer *et al.*, 1997).

Para ver la diferencia de expresión entre los genes, analizamos la relación entre N_0 de la muestra / N_0 del *housekeeping*.

4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de expresión de los genes obtenidos mediante las distintas qPCR fueron tratados con Excel y analizados con el programa estadístico de análisis Statgraphics Centurion XVII. Para el análisis estadístico de los datos se tuvieron en cuenta tanto un test paramétrico, T de Student como uno no paramétrico, W de Mann-Whitney, considerando en ambos un valor significativo de p-valor < 0.05. Además se utilizó el programa de libre acceso, G*Power 3.1, para saber el tamaño muestral necesario en cada experimento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR NCL

Las células NCL son células de hígado de ratón inmortalizadas mediante el método del antígeno T de SV40. Parten de hígados de ratones Tg, con el transgén de COX-2 insertado, (NCL-COX2) y de hígados de ratones Wt con un vector vacío (NCL-V). Para la realización de los experimentos se trabajó con poblaciones monoclonales de células transfectadas de manera estable, utilizando 2 clones distintos de NCL-COX2 (NCL-C1 y NCL-C3) y un único clon de NCL-V.

Una vez seleccionados los clones resistentes con expresión de *hCOX-2* utilizando puromicina, se llevaron a cabo experimentos para la comprobación de la expresión del transgén en NCL-COX2 y de su ausencia en NCL-V.

Se aconseja, periódicamente, que en todos los cultivos celulares se hagan ensayos para determinar si hay contaminación por micoplasmas. A lo largo de todos los experimentos, se realizaron éstos para comprobar que no había contaminación que pudiera afectar a los resultados, siendo todos los ensayos negativos a la presencia de micoplasmas.

5.1.1. *hCOX-2* PCR de comprobación

Previamente a la realización de los experimentos de qPCR, tras la extracción del mRNA y su posterior retrotranscripción a cDNA, la expresión de *hCOX-2* se comprobó amplificándolo por PCR y separado por electroforesis observando una banda entre 500 y 300 pb tal y como se ve en la Figura 7.

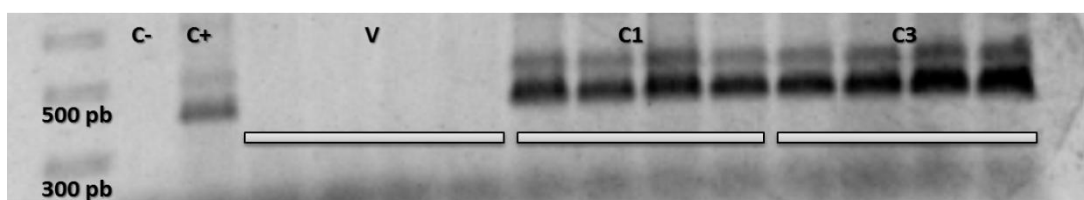


Figura 7. Expresión del transgén *hCOX-2*. Se muestran los controles C+ y C- que confirma la aparición de la banda entre 500 y 300 pb en C1 y C3 y la ausencia en V. El C+ fue realizado con una muestra que contiene *hCOX-2*, previamente comprobada en el laboratorio, y el C- realizado con agua.

hCOX-2 estuvo presente en todas las muestras de NCL-COX2, tanto de un clon como de otro, y ausente en NCL-V. Esto se confirma con la utilización de controles positivos y negativos (también mostrados en la Figura 7).

5.1.2. Determinación de la actividad de COX-2

Para determinar la funcionalidad de la enzima expresada se midió la concentración de PGE₂ en el sobrenadante de los cultivos mediante un ELISA. Dicha concentración se determinó también en células tratadas con DFU, 5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metil-sulfonil) fenil-2(5H)-furanona (inhibidor selectivo de COX-2) (Riendeau *et al.*, 1997) y sin tratar, para verificar la funcionalidad enzimática de COX-2.

En la Figura 8 se muestra como los niveles de PGE₂ son superiores en ambos clones de NCL-COX2 con respecto a NCL-V. Además, la concentración de PGE₂ disminuye significativamente en las células tratadas con DFU que tienen hCOX-2 (Figura 9).

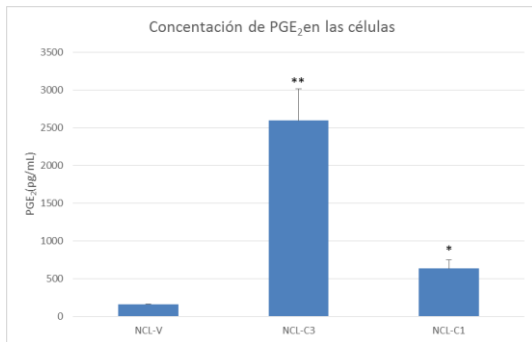


Figura 8. Niveles de PGE₂ en las células NCL. Siendo * p-valor < 0.05 con respecto a NCL-V y ** p-valor < 0.01 con respecto a NCL-V utilizando el estadístico t de Student.

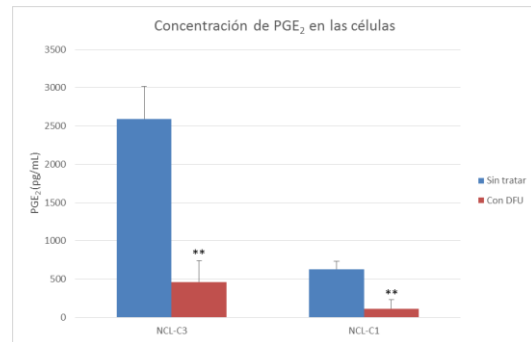


Figura 9. Diferencia de los niveles de PGE₂ en las células NCL-COX2 tratadas con DFU y sin tratar. Siendo ** p-valor < 0.01 con respecto a NCL (C1 o C3) sin tratar con DFU utilizando el estadístico t de Student.

5.1.3. Expresión de hCOX-2

Un método de comprobación que determina si existe una diferencia a nivel de expresión génica entre una muestra y otra es la qPCR. En este caso se comprobó la sobreexpresión de hCOX-2 en las células NCL, para ver que realmente existía una diferencia significativa en la expresión del gen que, más adelante, nos corroboraría los resultados de los demás análisis de los genes.

Para ello se utilizó la qPCR con sondas Taqman, descrita en “MATERIALES Y METODOS”. La diferencia entre células resultó significativa, presentándose un aumento de más de 3 veces en la expresión en NCL-COX2.

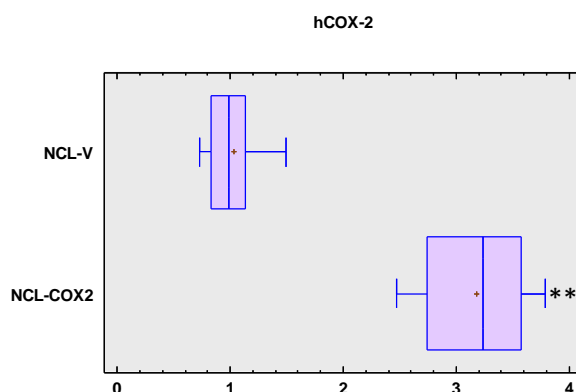


Figura 10. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de hCOX-2 en células NCL-V y NCL-COX2. Presenta un nivel de significación de 0,00000316951 < 0.05 a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de 0,00507498 < 0.05 a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método 2^{-ΔΔCt}. **p-valor < 0.01, con respecto de NCL-V, con t de Student suponiendo varianzas desiguales. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

5.1.4. Inmunofluorescencia para la detección de *hCOX-2*

Por último se procedió al estudio de la presencia de *hCOX-2* mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia. Para ello se hizo una inmunotinción de *hCOX-2* en las células con un anticuerpo primario monoclonal anti-*hCOX-2* y se utilizó Hoestch para marcar el núcleo. Se confirmó la ausencia de la proteína en NCL-V y su presencia en NCL-COX2 como se muestra en la Figura 11. La *hCOX-2* se observó en su localización habitual en la célula.

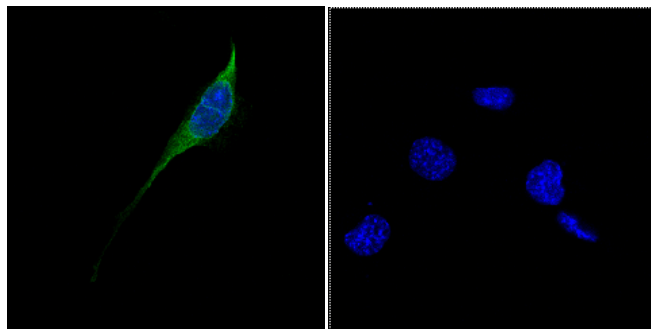


Figura 11. Determinación visual de *hCOX-2* en células NCL transfectadas de manera estable, NCL-V (imagen derecha) y NCL-COX-2 (imagen izquierda), mediante inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal anti-*hCOX-2* (verde) y Hoestch (azul). Fuente: imágenes de microscopía confocal (Leica SP8).

5.2. ANÁLISIS DE DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN ENTRE TRANSGÉNICOS Y WILD TYPE

Tras observar los resultados obtenidos del análisis de los datos de los arrays de genómica, se decidió validar algunos de los genes que aparecían sobreexpresados en los animales Tg con respecto a los Wt. Dichos genes tienen una relación aparente con COX-2 que puede comprobarse gracias al análisis metabolómico realizado. Con ambos estudios se seleccionaron los genes más adecuados para validar, basándose en los perfiles cruzados obtenidos de los análisis.

5.2.1. Resultados de la metabolómica

Con el estudio de los metabolitos alterados, ya fuesen aumentados o disminuidos, se pretende encontrar qué rutas relacionadas con COX-2 se encuentran alteradas y qué genes podrían estar causando estas alteraciones.

El estudio se llevó a cabo analizando los metabolitos implicados en la lipogénesis de *novo*, la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos n-3 y n-6, el ciclo de la metionina, biosíntesis de lípidos, biosíntesis de ácidos biliares, biosíntesis de aminoácidos y el ciclo del ácido cítrico. Muchos de los metabolitos que resultaron significativamente alterados eran intermediarios del metabolismo del ácido linoleico, o lo que es lo mismo, de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos n-6, como se puede observar en la Figura 12. Uno de los metabolitos de esta ruta es el AA, sustrato de COX-2, que se encuentra significativamente aumentado en los animales Tg.

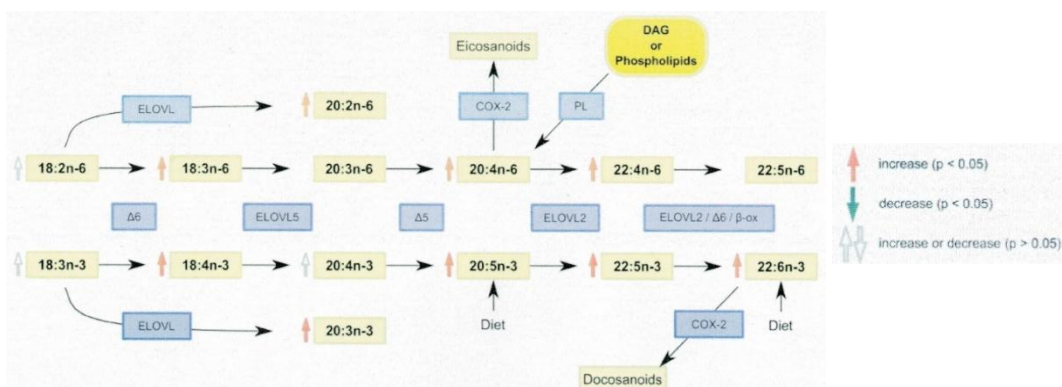


Figura 12. Ruta de biosíntesis de ácidos grasos omega-3 y omega-6. Diacilgliceridos (DAG), Δ -6 desaturasa (Δ 6D), Δ -5 desaturasa (Δ 5D), β -oxidación (β -ox), fosfolipasa (PL). Como se observa están incrementados los metabolitos ácido γ -linolénico (18:3, n-6), ácido eicosadienoico (20:2, n-6), ácido docosatetraenoico (22:4, n-6), AA (20:4, n-6), ácido moroctico (18:4, n-3), ácido eicosapentanoico (20:5, n-3), ácido docosapentaenoico (22:5, n-3), ácido docosahexaenoico (22:6, n-3) y ácido eicosatrienoico (20:3, n-3). Implicando en estos cambios a las enzimas que se observan, Elov1 5, Δ -6 desaturasa, Δ -5 desaturasa y Elov1 2. Fuente: OWL Metabolomics.

Podemos decir que aparentemente esta ruta está alterada y por tanto alguna o algunas de las enzimas de la misma se hayan alteradas, ya que los metabolitos que hay aumentados (Figura 12) pertenecen a las rutas de biosíntesis de Omega 3 y Omega 6. Así pues se estudió qué ocurre con las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido linoleico en el hígado.

En general, la metabolómica, nos indicó que había un aumento muy significativo en el número de PUFAs en Tg, tal y como vemos en la ruta del ácido linoleico. Además, se planteó que podría haber un incremento potencial en la actividad de ciertas enzimas:

- En la actividad general de las desaturasas
- Esteroil-CoA Desaturasa 1 (Scd 1)
- Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT)
- Fosfolipasa A2 (Pla2)

Con estos indicios previos se decidió estudiar los niveles de expresión de algunas elongasas y desaturasas hepáticas y de fosfolipasas relacionadas con COX-2 y el AA.

5.2.2. Elongasas

Las elongasas son las enzimas encargadas de la elongación de ácidos grasos, descrita anteriormente. Tienen un papel fundamental en el primer paso de la elongación, la condensación, aunque esto no se conoció hasta 1996 cuando se describieron estas enzimas indispensables para la elongación de ácidos grasos de cadena larga (Toke y Martin, 1996). La expresión de las elongasas varía durante las distintas etapas del desarrollo, así como por la dieta, hormonas o en patologías crónicas (Jakobsson *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2001; Wang *et*

al., 2005). Cualquier cambio en su actividad repercutirá notablemente en la composición lipídica celular.

Como ya se ha mencionado antes, 5 de los 7 tipos de elongasas están en hígado:

- **Elovl 1.** Se encuentra en todos los tejidos murinos que se han analizado, por lo que se considera como un gen de control endógeno (*housekeeping*) (Tvrđik *et al.*, 2000). Estudios en levaduras han demostrado el papel de Elovl 1 en la formación de ácidos grasos de hasta 26 carbonos y su importancia en la formación de lípidos de membrana, como esfingolípidos (Oh *et al.*, 1997).
- **Elovl 2.** Se encuentra en mayor abundancia en testículos e hígado y en menor en cerebro, riñón y tejido adiposo blanco (Tvrđick *et al.*, 2000). Está implicada en la elongación de ácidos grasos poliinsaturados como el AA (20:4, n-6) y ácido eicosapentanoico(20:5, n-3) (Leonard *et al.*, 2002).
- **Elovl 3.** Se encuentra en tejido adiposo marrón, folículos pilosos e hígado. Se han hecho estudios que revelaron un aumento de la expresión de este enzima en tejido adiposo marrón bajo estímulos como el frío (Tvrđick *et al.*, 1997), inyección de noradrenalina y por una dieta rica en calorías. Tiene un papel fundamental en la elongación de ácidos monoinsaturados de hasta 24 carbonos de longitud.
- **Elovl 5.** Está altamente expresada en testículos, glándulas suprarrenales e hígado, aunque también se encuentra expresado en menor medida en todos los tejidos que se han ensayado (Leonard *et al.*, 2000). Algunos estudios sugieren que tiene un papel muy importante en el desarrollo del hígado durante la etapa postnatal (estudios de expresión génica en ratas) (Wang *et al.*, 2005). Esta enzima elonga ácidos grasos poliinsaturados de 18 y 20 carbonos de longitud (Moon *et al.*, 2001). Su sobreexpresión en hepatocitos de rata llevó a un aumento de la elongación del AA (20:4, n-6) en ácido adrenico (22:4, n-6) y ácido eicosapentanoico (20:5, n-3) en ácido docosapentanoico (22:5, n-3) (Wang *et al.*, 2008). Por otro lado, estudios sobre ratones transgénicos deficientes en Elovl 5 mostraron una reducción de la actividad elongasa en el ácido γ -linolénico y en el ácido estearidónico entre un 88-90%, siendo ambos ácidos productos de la elongación del ácido linoleico y del ácido α -linolénico, respectivamente, que se mostraban por su parte aumentados con respecto a los animales control. Además, se dio una disminución de los productos finales de las rutas de síntesis de PUFAs n-3 y n-6, concretamente hubo una reducción de los niveles de AA en un 37% y del ácido docosahexanoico en un 32% (Moon *et al.*, 2008). Por todo ello podemos establecer una supuesta relación entre la actividad de esta elongasa y el AA.
- **Elovl 6.** Se encuentra expresado altamente en hígado de ratón y tejido adiposo, pero también en otros tejidos a un nivel menor. Desempeña un papel fundamental en la elongación de ácidos grasos de cadena larga saturados y monoinsaturados tales como el ácido palmítico y el palmitoleico que son elongados a ácido esteárico y oleico respectivamente (Moon *et al.*, 2001). Ratones deficientes en Elovl 6 (Elovl 6^{-/-}), han mostrado una disminución en la elongación del ácido palmítico y palmitoleico. Su sobreexpresión, además de aumentar la elongación para dar lugar al ácido esteárico y el ácido oleico, dirige la síntesis del ácido palmítico (Inagaki *et al.*, 2002).

En general, la dieta afecta a la actividad de las elongasas 5 y 6 y a su abundancia de mRNA en la célula. Por ejemplo, se ha visto que una dieta rica en productos que contienen omega 3 aumenta la expresión de Elovl 5. (Wang *et al.*, 2005).

Como hemos visto, además de diferir a nivel de expresión y localización, las elongasas se diferencian en los ácidos grasos que son capaces de elongar. Resumiendo, las elongasas 1, 3 y 6 alargan las cadenas de los ácidos grasos monoinsaturados y las elongasas 2, 4 y 5 la de los poliinsaturados (a excepción del ácido palmitoleico, monoinsaturado, que es elongado por Elovl 5 (Wang *et al.*, 2006).

Las elongasas que no se encuentran en hígado son:

- **Elovl 4.** Se ha detectado en piel y retina. Mutaciones en su gen se asocian a pérdida de visión como consecuencia de una distrofia macular (Grayson y Molday, 2005). Interviene en la síntesis de ácidos grasos saturados de la piel de 28 y 30 carbonos y poliinsaturados de la retina de 28 a 38 carbonos (Agbaga *et al.*, 2008).
- **Elovl 7.** Ha sido caracterizada hace pocos años, de modo que su estudio en hígado no se ha desarrollado por completo todavía, aunque parece indicar que podría estar en todos los tejidos salvo el cardiaco y el muscular (Naganuma *et al.*, 2011).

Su relación con la actividad de las desaturasas es fundamental para la biosíntesis de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Por ejemplo Elovl 6 junto con $\Delta 9$ -desaturasa generan ácidos grasos monoinsaturados de 18 carbonos como el ácido oleico (Wang *et al.*, 2006), pero también Elovl 2 y Elovl 5 junto con $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa son capaces de generar los productos finales de las rutas omega 6 y 3, como el AA (Leonard *et al.*, 2004). Además, en ratones, la elongasa 5 y 6 y las Scd hepáticas están inducidas por la activación de PPAR α (del inglés *peroxisome proliferator-activates receptor α*) y una deficiencia en leptina (Wang *et al.*, 2006). Lo que remarca aún más la relación existente entre elongasas y desaturasa.

Las elongasas que se han comprobado en este trabajo son *Elovl 5* y *Elovl 6*.

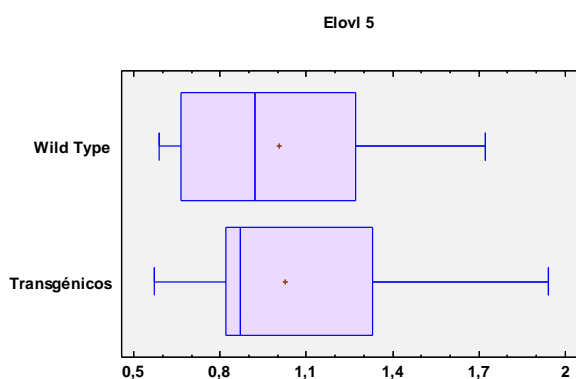


Figura 13. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Elovl 5 en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,877829 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0.958603 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Para una mayor fiabilidad de los resultados también se utiliza el programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa. Utilizando el test estadístico W de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño muestral de 7167 muestras Wt y 7167 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del

95,00%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

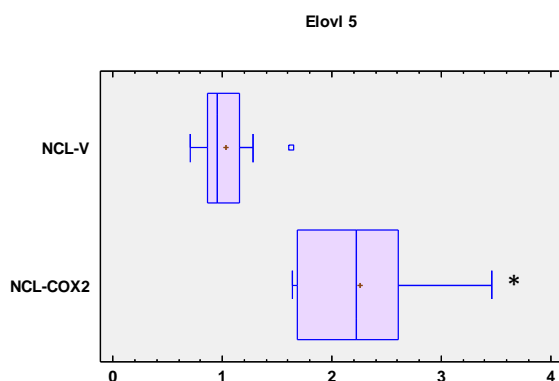


Figura 14. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Elovl 5 en células NCL-V y NCL-COX2. Presenta un nivel de significación de $0,00000303717 < 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0.000124199 < 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. * p-valor < 0.05 , con respecto de NCL-V, con la t de Student suponiendo varianzas desiguales. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en

En células se pudo comprobar que existía una diferencia significativa, verificándose con los estadísticos t de Student y W de Mann-Whitney. Disponiendo de un número de muestras de 10 NCL-V y 11 NCL-COX2, se pasó a comprobar con el G*Power si se disponía de un tamaño muestral adecuado. Efectivamente, el tamaño era suficiente para corroborar que la diferencia era significativa (el número de muestras por parte del programa eran de 5 NCL-V y 5 NCL-COX2 y un nivel de confianza de 97,08%).

Al no coincidir con los resultados del tejido, se decidió analizar otro clon de células distinto, NCL-COX2 C3. A priori, los resultados entre ambos clones de NCL-COX2 no diferían demasiado. Ambos clones mostraban una sobreexpresión significativa con respecto a NCL-V, comprobada gracias a la realización de un test ANOVA (como se observa en la Figura 1 del ANEXO). Sin embargo el número de muestras de NCL-COX2 C3 no eran suficientes como para considerar esa significación. Se observa como la sobreexpresión en el clon C3 es menor que en el clon C1, por lo que cabría pensar que un aumento en el tamaño muestral podría llegar a dar unos valores de expresión no significativos con respecto a las células control. Además los valores de sobreexpresión (aproximadamente el doble con respecto a NCL-V) se alejan mucho de lo que ocurre en el tejido por lo que este modelo celular no es representativo de lo que ocurre en el organismo (en este caso en los hígados de ratones).

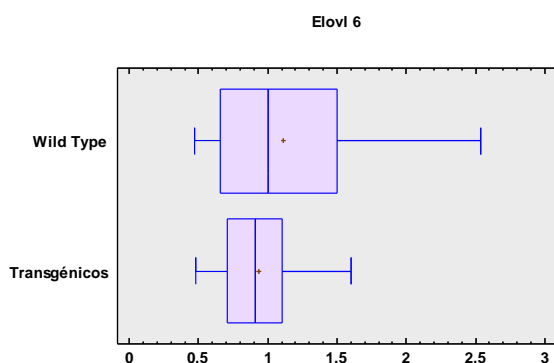


Figura 15. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Elovl 6 en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,299942 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0.533827 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Para una mayor fiabilidad de los resultados también se utiliza el programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa.

Utilizando el test estadístico W de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño muestral de 185 muestras Wt y 185 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del 95,09%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

En células se pudo comprobar que existía una diferencia significativa, verificándose con los estadísticos t de Student y W de Mann-Whitney. Disponiendo de un número de muestras de 10 NCL-V y 11 NCL-COX2, se pasó a comprobar con el G*Power si se disponía de un tamaño muestral adecuado. Efectivamente, el tamaño era suficiente para corroborar que la diferencia era significativa (el número de muestras por parte del programa eran de 9 NCL-V y 9 NCL-COX2).

Al no coincidir con los resultado del tejido, se decidió analizar otro clon de células distinto, NCL-COX2 C3. A priori, los resultados entre ambos clones de NCL-COX2 diferían mucho, dando las NCL-COX2 C1 una expresión por debajo de NCL-V y las NCL-COX2 C3 superior a los valores de NCL-V (como se observa en la Figura 2 del ANEXO). Estas diferencias entre los distintos clones pueden ser debidas a la localización del transgén a la hora de realizar el transgénico, ya que pudo haberse translocado y modificar algún gen que no tenga relación con COX-2, dando así una información errónea.

5.2.3. Desaturasas

Las esteroil-CoA Desaturasa (Scd) son enzimas localizadas en el retículo endoplasmático que catalizan la síntesis de ácidos grasos mono y poliinsaturados de forma endógena (Jacobson *et al.*, 1974). Pertenecen a la familia de las oxidoreductasas que utilizan el O₂ como oxidante y lo incorporación o reducen (Behrouzian y Buist, 2002). Utilizan como cofactor un compuesto con hierro, como la ferredoxina.

De las dos isoformas que se estudian en este trabajo, **Scd 1** y **Scd 2**, se conoce que Scd 1 se encuentra principalmente en el tejido adiposo blanco y marrón y en hígado, además de en las glándulas productoras de lípidos como las glándulas Meibomio y preputial (Miyazaki *et al.*, 2001) y Scd 2 está altamente expresada en hígado y se ha detectado en cerebro. Ambas son dos formas distintas de las 4 Δ^9 -desaturasas que hay en ratón, es decir, que introducen la insaturación en el carbono 9.

Estudios recientes de Scd 1 han demostrado su importancia en el desarrollo de resistencia a la insulina hepática inducida por la dieta (Gutiérrez-Juárez *et al.*, 2006).

Se sabe que entre los pasos bioquímicos asociados a la mejora de la sensibilidad a la insulina se encuentra la disminución de expresión de esta enzima (Hammond *et al.*, 2005). Por otra parte, diversos estudios han demostrado la importancia de Scd 2 en la síntesis de lípidos en el desarrollo temprano y su necesidad para la supervivencia (Miyazaki *et al.*, 2005). Estos resultados indican que la expresión de Scd 1 es importante en ratones adultos y la de Scd 2 es crucial en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados requeridos para mantener la función de barrera de permeabilidad epidérmica normal y la biosíntesis de los lípidos de la piel durante el desarrollo temprano y el hígado.

Según los resultados obtenidos de la qPCR, tanto para células como para tejido, no se observan diferencias significativas entre las muestras para los genes *Scd 1* y *Scd 2* (las Figuras 16 y 17 representan las diferencias entre tejidos Wt y Tg. Los diagramas correspondientes a las diferencias entre células se encuentran descritos en el ANEXO, Figura 3 y Figura 4).

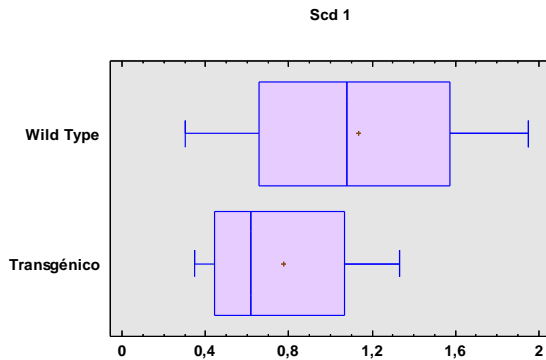


Figura 16. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de *Scd 1* en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,0399847 < 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la *t* de Student y de $0.056392 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la *W* de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Dadas las diferencias de significación entre los dos parámetros estadísticos realizados, es imprescindible la utilización del programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa y así llegar a una conclusión. Utilizando el test estadístico *W* de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño muestral de 46 muestras Wt y 46 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del 95,39%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

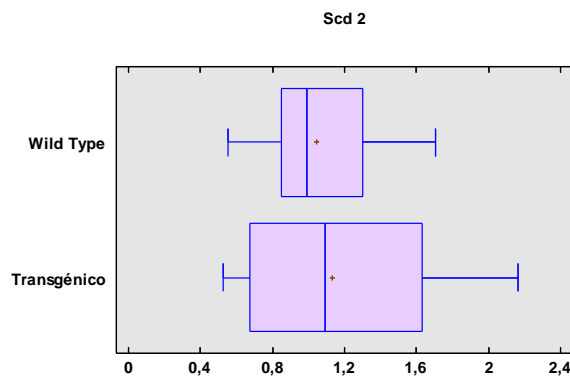


Figura 17. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de *Scd 2* en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,594639 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la *t* de Student y de $0.803458 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la *W* de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Para una mayor fiabilidad de los resultados también se utiliza el programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa. Utilizando el test estadístico *W* de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño muestral de 706 muestras Wt y 706 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del 95,01%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

Además de estudiar *Scd 1* y *Scd 2*, en este trabajo se estudió una de las dos isoformas de las desaturasas de ácidos grasos, *Fads 2*.

Fads 2 pertenece a la familia de las desaturasas de ácidos grasos. Catalizan la reacción de desaturación de ácidos grasos a través de la introducción de dobles enlaces de la cadena hidrocarbonada. Son consideradas como productos de la fusión de un dominio tipo citocromo b5 (en N-terminal) y una porción de desaturasa de membrana (en C-terminal) (Marquard *et al.*, 2000). Se llaman también $\Delta 6$ -desaturasa de ácidos grasos porque introduce la insaturación en el carbono 6 de la cadena.

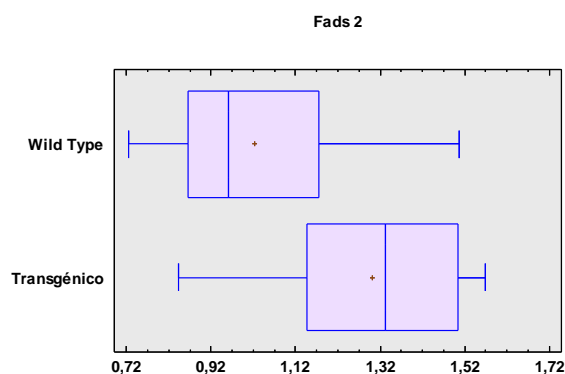


Figura 18. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Fads 2 en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,00640879 < 0,05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0,0147158 < 0,05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

En este caso, los estadísticos t y W tienen ambos un p-valor $< 0,05$, lo que nos indicaría qué existe diferencia significativa entre las muestras. Sin embargo, como podemos observar en el diagrama, no se detecta una separación clara de las cajas. Además realizando la prueba t-test para muestras con varianzas desiguales en el Excel, el resultado es que no hay diferencias significativas. Como en los demás casos, se utilizó el programa G*Power para determinar qué tamaño muestral sería necesario para obtener significación, concluyendo que con 21 muestras de Wt y 21 de Tg, podríamos aceptar la significación.

Por tanto, en este caso, se deduce que no existe una diferencia evidente entre las muestras debido al tamaño muestral. En este caso, sí que sería interesante aumentar el número de muestras y así poder obtener un resultado positivo para esta diferencia.

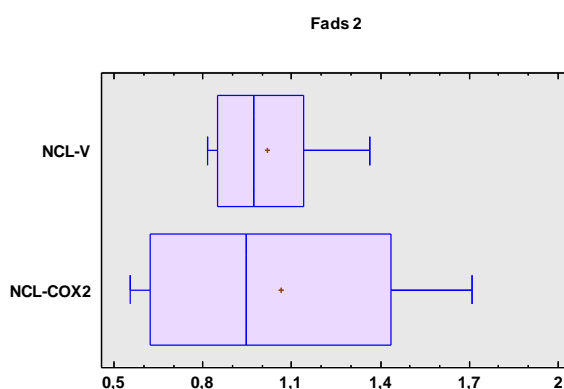


Figura 19. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Fads 2 en células NCL-V y NCL-COX2. Presenta un nivel de significación de $0,728391 > 0,05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0,80532 > 0,05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics

Sin embargo, al analizar este gen en células, no se vieron diferencias significativas. Además, G*Power nos indicó un número de muestra de 1116 muestras de NCL-V y 1116 de NCL-COX2, quedando confirmada la no diferencia existente.

5.2.4. Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas del tipo hidrolasa-lipasa que juegan un rol importante en una variedad de procesos celulares, incluyendo la digestión y metabolismo de fosfolípidos, así como la producción de precursores para reacciones inflamatorias. Son responsables de la movilización de los PUFAs liberados por la hidrólisis sn-2 del enlace éster de los fosfolípidos, incluyendo al AA.

En este trabajo se estudió la expresión de dos fosfolipasas, la fosfolipasa A2 g16 (Pla2g16) y la fosfolipasa D 1 (Pld 1).

Pla2g16

Las Pla2 se clasifican según su funcionalidad y localización en: citosólicas de alto peso molecular y secretoras de bajo peso molecular. A su vez también se pueden clasificar según su dependencia al calcio. De esta manera existen 16 grupos de Pla2 (del I al XVI, siguiendo la nomenclatura de la *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* y la IUPAC). La asignación a los distintos grupos depende de los mecanismos catalíticos que utilicen siendo su actividad determinada por tres dianas aminoacídicas distintas: histidina/aspartato, serina/aspartato y serina/histidina/aspartato. A nivel general, estos grupos pueden asociarse en 5 grupos principales: enzimas secretoras (sPLA2), enzimas citosólicas (cPLA2), enzimas calcio-independientes (iPLA2), enzimas degradantes de los mediadores autocoides conocidos como factores activadores plaquetarios (PLA2-PAF-AH) y enzimas lisosomales calcio-independiente (L-PLA2) (Alfonso y García, 2009).

La Pla2g16 es dependiente de calcio y del pH. Su función principal es catalizar la hidrólisis preferencial de fosfatidilcolinas en la posición sn-2 para la generación de ácidos grasos libres. Además regula la lipólisis de los adipocitos y la liberación de ácidos grasos a través de una vía acoplada a proteína G que implica prostaglandinas en tejido adiposo blanco. Así pues en este tejido cataliza el paso limitante de la producción de AA, para la producción de prostaglandinas, especialmente PGE₂ (Fajas *et al.*, 2003). También se sabe que desempeña un papel crucial en el desarrollo de la obesidad en modelos de ratón (Jaworski *et al.*, 2009). Es importante destacar que contiene un dominio que atraviesa la membrana en el extremo C-terminal, que se localiza intracelularmente muy próximo de COX-1 (Duncan *et al.*, 2008).

Según los resultados obtenidos de la qPCR, tanto para células como para tejido, no se observan diferencias significativas entre las muestras del gen *Pla2g16* (la Figura 20 representa las diferencias entre tejidos Wt y Tg. Los diagramas correspondientes a las diferencias entre células se encuentran descritas en el ANEXO, Figura 5).

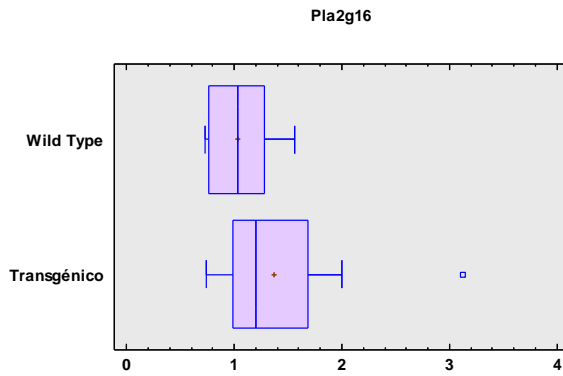


Figura 20. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Pla2g16 en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,0685521 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0,0970907 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Para una mayor fiabilidad de los resultados también se utiliza el programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa. Utilizando el test estadístico W de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño muestral de 69 muestras Wt y 69 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del 95,16%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

Pld 1

Las fosfolipasas D son enzimas que hidrolizan el lípido fosfatidilcolina dando lugar a ácido fosfatídico y colina. Se encuentran en la membrana plasmática. En humanos hay dos isoformas, Pld 1 y Pld 2. Se relacionan con vías de transducción de señales ya que interactúan con proteínas quinasas de las cuales, algunas pertenecen a la ruta MAP quinasa (Paruch *et al.*, 2006). El ácido fosfatídico liberado se hidroliza rápidamente por parte de la ácido fosfatídico fosfohidrolasa dando lugar al diacilglicerol, a partir del cual se puede sintetizar AA (Presscott y Majerus, 1983).

Según los resultados obtenidos de la qPCR, tanto para células como para tejido, no se observan diferencias significativas entre las muestras del gen *Pld 1* (la Figura 21 representa las diferencias entre tejidos Wt y Tg. Los diagramas correspondientes a las diferencias entre células se encuentran descritos en el ANEXO, Figura 6).

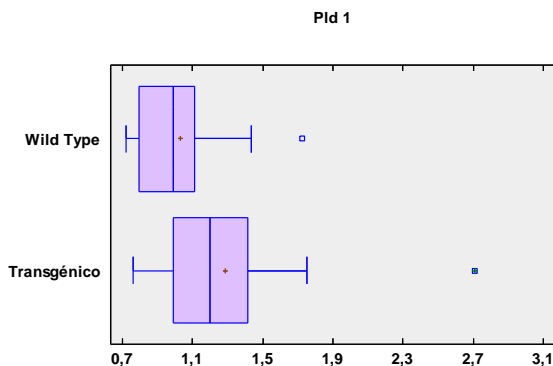


Figura 21. Representación de diagrama Box and Whisker de los niveles de expresión de Pld 1 en animales Wt y Tg. Presenta un nivel de significación de $0,0891967 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la t de Student y de $0,056392 > 0.05$ a un nivel de confianza del 95% para la W de Mann-Whitney. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$. Fuente: elaboración propia en Statgraphics Centurion XVII.

Para una mayor fiabilidad de los resultados también se utiliza el programa libre G*Power 3.1 para indicar qué tamaño muestral sería necesario para que esa diferencia sea significativa. Utilizando el test estadístico W de Mann-Whitney, en este caso haría falta tener un tamaño

muestral de 67 muestras Wt y 67 muestras Tg para conseguir un nivel de confianza del 95,04%. Al necesitar tantas muestras para obtener una diferencia significativa, queda confirmado que no existe variación en la expresión entre Wt y Tg para este gen.

5.2.5. Análisis de células tratadas con DFU

Para corroborar si realmente las diferencias de expresión que se observaron en células se deben o no a COX-2, se trataron con un inhibidor selectivo de COX-2, el DFU. En concreto se analizaron si estas diferencias de expresión en los genes *Elovl 5* y *Elovl 6* variaron, ya que fueron los únicos genes en células que marcaban diferencias significativas.

El experimento dio como resultado que COX-2 no afectaba a los niveles de expresión de estos genes, observándose los mismos niveles de expresión en células tratadas y sin tratar como se ve en la Figura 22:

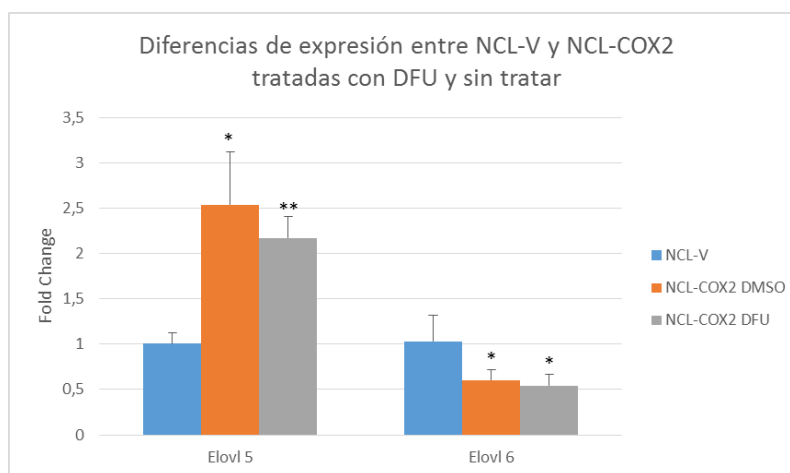


Figura 22. Diferencias de expresión entre NCL- V y NCL-COX2 tratadas y sin tratar con DFU. * representa un p-valor < 0.05 con respecto a NCL-V y ** representa un p-valor < 0.01 con respecto a NCL-V utilizando el estadístico t de Student. Datos analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C^t}$.

Por tanto se puede deducir que las diferencias de expresión no se deben a COX-2 y ello puede ser el motivo de la discrepancia que se presenta entre el modelo animal y el modelo celular.

5.3. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE DATOS DE qPCR: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ VS PROGRAMA LinRegPCR

5.3.1. Cómo calcula cada método el “dato cuantitativo” (Ct o N_0 según sea $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o LinRegPCR respectivamente) para analizar las diferencias entre las muestras.

El $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nos va a devolver los valores de Ct de cada gen para que sean analizados, asumiendo que la eficiencia máxima de las PCR es siempre 2 (el 100% de amplificación). Este Ct viene determinado por la línea base, siendo la misma para todos los genes, que establece el programa que viene con el termociclador (Applied Biosystems). De este modo, con los Ct conseguimos una aproximación a la realidad en las condiciones ideales de PCR. Por tanto la fiabilidad de este método depende de que las variaciones en la condiciones de la PCR sean mínimas, por ejemplo, si los componentes de la PCR no estuvieran en las condiciones óptimas para su utilización.

Los datos de entrada que va a utilizar el programa LinRegPCR son los datos brutos de la amplificación, sin la línea base corregida, que nos devuelve el termociclador. El programa nos dará los valores de N_0 como “dato” para calcular las diferencias entre muestras. Este valor es la cantidad inicial de cDNA de cada gen (calculada a partir de la ecuación anteriormente descrita en “MATERIALES Y METODOS”), que tiene en cuenta, además del Cq, la eficiencia de cada amplicón. Así pues, el programa calcula la eficiencia de PCR de cada amplicón por separado así como su línea base corregida. Por tanto los métodos que describe Ruijter *et al* (2009), tiene en cuenta variables de la PCR que el anterior método no tiene, por lo que es una aproximación más fiable a la realidad. Sin embargo, al programa, previamente al cálculo que debe realizar, hay que indicarle una serie de parámetros, como el tipo de sonda utilizada, el material genético que se amplifica y el formato de entrada de los datos, ya que dispone de varios métodos de cálculo según se trate de unos parámetros u otros.

5.3.2. Diferencias en el análisis de los datos

Una vez se tiene clara la forma de cálculo de un método y otro, se puede comprobar qué diferencias existen en cuanto al análisis de expresión de los genes en las muestras analizadas.

En general, en todos los experimentos realizados, una vez los datos son analizados, se observa cómo la **desviación estándar** de los genes disminuye con la utilización del LinRegPCR con respecto al método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este hecho influye a la hora de realizar los análisis estadísticos correspondientes (t-test y W-Mann and Whitney) ya que se nos presentan genes diferencialmente expresados que con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ no aparecían o el nivel de significación aumenta. Con esta disminución de la desviación estándar, también se observa cómo las diferencias entre las muestras del mismo gen son más aparentes o por el contrario, genes que a simple vista presentan dudas y su análisis estadístico está en el límite de la significación, o los separa o los acerca del nivel de la muestra control, disipando estas dudas. Esto puede observarse en la Figura 23 donde se ve la disminución de la desviación estándar en todas las muestras con el LinReg PCR.

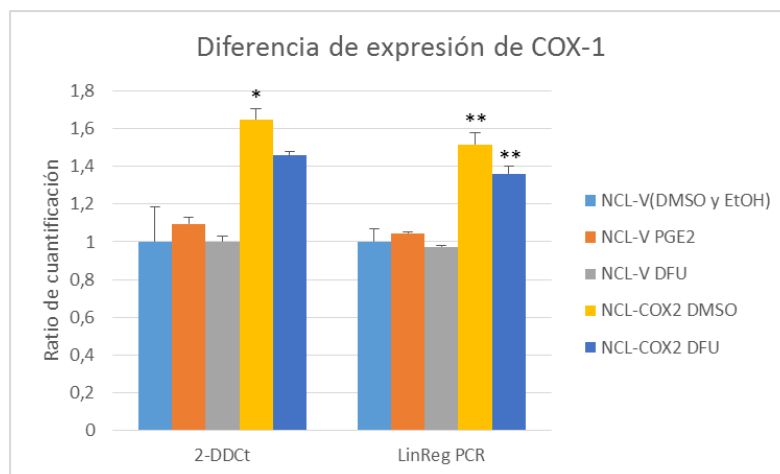


Figura 23. Representación de los niveles de expresión de COX-1 en las diferentes muestras de células NCL-V y NCL-COX2 tratadas o no con DFU. Se observa una diferencia significativa en los niveles de expresión de COX-1 en la muestra NCL-COX2 DMSO con respecto al control NCL-V, con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, mientras que con LinReg PCR vemos diferencias significativas también con la muestra NCL-COX2 DFU. Siendo * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, con respecto de NCL-V(DMSO y EtOH), utilizando la t de Student como estadístico.

Al igual que se obtiene una desviación estándar menor con LinReg PCR, también se observa cómo las **diferencias de expresión** en distintos genes disminuye con respecto al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Sin embargo, esto no afecta a que las diferencias de expresión entre las muestras sigan siendo significativas.

En la Figura 24 se observa dicha disminución en la diferencia de expresión de *Elovl 5*. Con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se obtiene un aumento en la expresión de un 102.90%, mientras que con LinReg PCR, el aumento de la expresión es de un 66.17%, siendo ambos aumentos significativos.

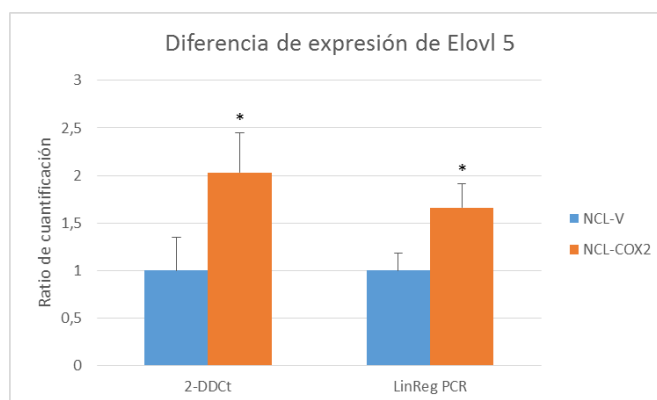


Figura 24. Representación de los niveles de expresión de *Elovl 5* en las diferentes muestras de células NCL-V y NCL-COX2. Se observa como con ambos métodos existe una diferencia significativa con un p-valor < 0.05 con respecto de NCL-V, representado con *, utilizando como estadístico la t de Student.

6. CONCLUSIONES

Como hemos ido viendo a lo largo del trabajo, la labor de analizar lo que sucede con un gen o proteína en un tejido o en un organismo, comprende un compendio de pruebas y ensayos complementarios que le den validez a los resultados. En nuestro caso, queremos estudiar qué fenómenos provoca la existencia de COX-2 en hígado para poder aplicar dichos conocimientos en condiciones patológicas del hígado y así poder plantear estudios más específicos.

Disciplinas emergentes de la biología molecular como la genómica, la metabolómica, la proteómica, etc. (ómicas, en general), así como las técnicas que han sido desarrolladas para estudiar estas disciplinas, dan al investigador información que permite dirigir el trabajo experimental con mayor precisión hacia unos resultados concretos. Aun con todos estos avances, es necesario ir validando los datos obtenidos de estas plataformas masivas puesto que a pesar de dar mucha información, no toda es válida debido a los falsos positivos.

Para validar los datos y evitar resultados erróneos, comúnmente se utiliza la qPCR como técnica de validación, ya que puede comprobar entre un 85-90% de los resultados del array siempre y cuando tengan una expresión moderada (Wang *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo han sido capaces de descartar genes relacionados, aparentemente con COX-2, ya que no han habido diferencias significativas entre Tg y Wt. Sin embargo el estudio del gen *Fads 2*, nos ha permitido ver que sería necesario un análisis más exhaustivo para corroborar si realmente sus diferencias de expresión son significativas y si se deben a COX-2.

Con todo ello cabe resaltar la ayuda complementaria y totalmente necesaria de programas estadísticos que nos acerquen a un nivel de confianza que nos permita tomar decisiones. Programas como Statgraphics o SPSS, son programas estadísticos que se suelen utilizar para este tipo de validación de datos.

La experimentación animal en investigaciones biomédicas es la aproximación más real al estudio de una condición o patología. La legislación regula todos los aspectos a tener en cuenta sobre los ensayos realizados con animales. De este modo, todo experimentador debe conocer la regla de “Las 3 Rs”: Refinamiento, Reducción y Reemplazo (Russell y Burch, 1959).

En aras del bienestar animal, los cultivos celulares suponen el Reemplazo de animales para un experimento. Estos cultivos deben de ser líneas celulares bien caracterizadas y que nos otorguen una aproximación lo más cercana posible a lo que ocurre en un tejido. En nuestros experimentos hemos utilizado la línea celular NCL para comprobar que se obtenían los mismos resultados que en tejido. Realmente esto se pudo comprobar en genes como *Scd 1*, *Scd 2*, *Pla2g16* y *Pld 1*. En los genes *Elovl 5*, *Elovl 6* y *Fads 2*, vimos resultados que se contradecían. Sin embargo esto no quiere decir que la línea utilizada no sirva como modelo celular para estos experimentos, ya que como hemos visto es posible que las diferencias vengan dadas por el clon utilizado. Actualmente existen programas como el G*Power, que nos indica una aproximación al número de muestras necesarias para validar un experimento, en nuestro caso para validar las diferencias de expresión de los genes. En casos en los que no hay más remedio

que utilizar tejido animal para la validación de datos, supone una gran ayuda la determinación del tamaño muestral de animales a sacrificar. En el gen *Fads 2*, hemos obtenido que el tamaño muestral, con el que hemos realizado los experimentos, no era el suficiente para obtener una diferencia significativa. Sin embargo, el programa nos ha mostrado, qué aumentando el número de muestras (de 15 a 21), podríamos tener un resultado favorable en la diferencia de expresión con el nivel de confianza que nosotros queramos considerar.

Además de la validación de genes, en este trabajo se pretende hacer una comparación entre dos métodos de analizar datos de qPCR. Tras trabajar con ambos y ver algunas de las diferencias que mostraban los distintos tratamientos de datos, vemos que los dos métodos son válidos para el análisis de los datos. Personalmente me decanto por la utilización del programa LinRegPCR, ya que una vez volcados los datos de la qPCR, el tratamiento posterior es más exacto y se comete menos error. Si bien los ratios de cuantificación tienen sus propias ecuaciones que tienen en cuenta que las eficiencias de las qPCR no son del 100%, no se utilizan debido a la complejidad de las mismas y la necesidad de tener que manejar muchos datos para obtener un resultado. Por ello se utiliza el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que no tiene en cuenta la eficiencia de la qPCR. Así pues, resulta más cómodo el LinRegPCR que sí tiene en cuenta las eficiencias y no necesita de tantos datos para su manejo. Las diferencias que hemos visto a la hora de analizar la expresión de los genes, quedan más remarcadas con el programa LinRegPCR.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGBAGA, M.P.; BRUSH, R.S.; MANDAL, M.N.; HENRY, K.; ELLIOT, M.H.; ANDERSON, R.E., 2008. Role of stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105: 12843-12848.
- ALFONSO, G. y GARCIA, A., 2009. Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repert. Med. Cir.*, 18(4): 199-209.
- ALVAREZ, M.S., 2014. Papel de COX-2 en la fisiopatología cardíaca. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 184 pp.
- AMANDA, R.G.; SILER, K.; LARKIN, E.C., 1979. Diet-induced alterations in the discoid shape and phospholipid fatty acid composition of rat erythrocytes. *Lipids*, 14: 30-38.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; DENIS, E.A., 1998. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 7951-7956.
- BEHROUZIAN, B; BUIST, B.H., 2002. Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (5): 577–582.
- BERGSTROEM, S.; DANIELSSON, H.; KLENBERG, D.; SAMUELSSON, B., 1964. The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into Prostaglandins. *J Biol Chem*, 239: 4006-4008.
- BRANON, T. S.; NORTH, A. J.; WELLS, L. B.; SHAUL, P. W., 1994. Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression. *J. Clin. Invest*, 93: 2230–2235.
- CARTY, T. J. Y MARFAT, A., 1996. The Prospect for Improved Medicines. *Emerging Drugs*, pp. 391–411.
- CASADO, M.; CALLEJAS, N.A.; RODRIGO, J.; ZHAO, X.; DEY, S.K.; BOSCA, L.; MARTIN-SANZ, P., 2001. Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB J*, 15: 2016-2018.
- CASADO, M.; MOLLA, B.; ROY, R.; FERNANDEZ-MARTINEZ, A.; CUCARELLA, C.; MAYORAL, R.; BOSCA, L.; MARTIN-SANZ, P., 2007. Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology*, 45(3): 631-638.
- CHANDRASEKHARAN, N.V. Y SIMMONS, D.L., 2004. The cyclooxygenases. *Genome Biol*, 5(9): 241.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L., 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci*, 99(21): 13926-13931.
- CINTI, D.L.; COOK, L.; NAGI, M.N.; SUNEJA, S.K., 1992. The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res*, 31: 1–51.
- COMPANIONI, M., 1995. Ácido araquidónico y radicales libres: su relación con el proceso inflamatorio. *Rev Cubana Invest Bioméd* vol.14, n.1, pp. 0-0.

- COOK, H.W., 1985. Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. *Biochemistry of Lipids and Membranes*, 6: 181-212.
- CROFFORD, L.J., 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*, 49: 15-19.
- DEWITT, D.L., 1999. Cox-2-Selective Inhibitors: The New Super Aspirins. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 55: 625–631.
- DEWITT, D.L.; DAY, J.S.; SONNENBURG, W.K.; SMITH, W.L., 1983. Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I₂ synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J Clin Invest.*, 72(6): 1882-1888.
- DUBOIS, R.N. Y SMALLEY, W.E., 1996. Cyclooxygenase, NSAIDs and colorectal cáncer. *J Gastroenterol*, 31: 898-906.
- DUNCAN, R.E.; SARKADI-NAGY, E.; JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; SUL, H.S., 2008. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). *J Biol Chem.*, 283 (37): 25428–25436.
- EBERHART, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F. M.; FERRENBACH, S.; DUBOIS, R. N., 1994. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas an adenocarcinomas gastroenterology. *Gastroenterology*, 107: 1183–1188.
- FAJAS, L.; MIARD, S.; BRIGGS, M.R.; AUWERX, J., 2003. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors impair adipocyte differentiation through inhibition of the clonal expansion phase. *J. Lipid Res.*, 44 (9): 1652–1659.
- FERNANDEZ-MARTINEZ, A.; CALLEJAS, N.A.; CASADO, M.; BOSCA, L.; MARTIN-SANZ, P., 2004. Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *J Hepatol*, 40: 963-970.
- GARRIDO, A. Y TEIJO, J., 2003. *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. Ed. Tebar Flores, Madrid. 1ª ed. 382 pp.
- GIOVANNUCCI, E.; EGAN, K. M.; HUNTER, D. J.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; SPEIZER, F. E., 1995. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N. Engl. J. Med.*, 333: 609–614.
- GRAYSON, C. Y MOLDAY, R.S., 2005. Dominant negative mechanism underlies autosomal dominant stargardt-like macular dystrophy linked to mutations in ELOVL4. *J. Biol. Chem.*, 280: 32521-32530.
- GUTIERREZ-JUAREZ, R.; POCAI, A.; MULAS, C.; ONO, H.; BHANOT, S.; MONIA, B.P.; ROSSETTI, L., 2006. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.*, 116(6): 1686-1695.
- HAMMOND, L.E.; NESCHEN, S.; ROMANELLI, A.J.; CLINE, G.W.; ILKAYEVA, O.R.; SHULMAN, G.I.; MUOIO, D.M.; COLEMAN, R.A., 2005. Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J. Biol. Chem.*, 280:25629-25636.
- HEMLER, E.M.; SMITH, W.L.; LANDS, W.E.M., 1976. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 251 (18): 5575-5579.

- HIRATA, F.; STRACKE, M.L.; SCHIFFMANN, E., 1987. Regulation of prostaglandin formation by glucocorticoids and their second messenger, lipocortins. *J Steroid Biochem*, 27(4-6): 1053-1056.
- HLA, T. Y MACIAG, T., 1991. Cyclooxygenase Gene Expression is Down-regulated by Heparinbinding (Acidic Fibroblast) Growth Factor- 1 in Human Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, 266: 24059–24063
- HLA, T. Y NEILSON, K., 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 7384-7388.
- HU, K.Q., 2003. Cyclooxygenase 2 (COX2)-prostanoid pathway and liver diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69(5): 329-337.
- INAGAKI, K.; AKI, T.; FUKUDA, Y.; KAWAMOTO, S.; SHIGETA, S.; ONO, K.; SUZUKI, O., 2002. Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 613-621.
- JACOBSON, B.S.; JAWORSKI, J; STUMPF, P.F., 1974. Fat Metabolism in Higher Plants LXII. Stearyl-acyl Carrier Protein Desaturase from Spinach Chloroplasts. *Plant physiology*, 54 (4): 484–486.
- JAKOBSSON, A.; JORGENSEN, J.A.; JACOBSSON, A., 2005. Differential regulation of fatty acid elongation enzymes in brown adipocytes implies a unique role for Elovl3 during increased fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 289: 517-526.
- JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; DUNCAN, R.E.; SARKADI-NAGY, E.; VARADY, K.A.; HELLERSTEIN, M.K.; LEE, H.Y.; SAMUEL, V.T.; SHULMAN, G.I.; KIM, K.H.; DE VAL, S.; KANG, C.; SUL, H.S., 2009. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.*, 15 (2): 1598.
- JONES, D.A.; CARLTON, D.P.; MCNTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOOT, S.M., 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 268: 9049-9054.
- KERN, M.A.; SCHUBERT, D.; SAHI, D.; SCHÖNEWEISS, M.M.; MOLL, I.; HAUGG, A.M.; DIENES, H.P.; BREUHAHN, K.; SCHIRMACHER, P., 2002. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology*, 36(4): 885-894.
- KIS, B; SNIPES, J.A; ISSE, T.; NAGY, K.; BUSIJA, D.W, 2003. Putative Cyclooxygenase-3 Expression in Rat Brain Cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23: 1287-1292.
- KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R., 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, 266(20): 12866-12872.
- KURUMBAIL, R.G.; STEVENS, A.M.; GIERSE, J.K.; MCDONALD, J.J.; STEGEMAN, R.A.; PAK, J.Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J.M.; PENNING, T.D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.; STALLINGS, W.C., 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610): 644-648.
- KURZROK, R. Y LIEB, C.C., 1930. Biochemical studies of human semen: Action of semen on human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 28: 268-272.
- KUTCHERA, W.; JONES, D. A.; MATSUNAMI, N.; GRODEN, J.; MCLNTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; WHITE, R. L.; PRESCOTT, S. M., 1996. Cell Intrinsic Role of Cox-2 in Pancreatic Cancer Development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 4816–4820.

LANE, D.P.; CRAWFORD, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701): 261-263.

LARA-PEZZI, E.; GOMEZ-GAVIRO, M.V.; GALVEZ, B.G.; MIRA, E.; IÑIGUEZ, M.A.; FRESNO, M.; MARTINEZ, A. C.; ARROYO, A.G.; LOPEZ-CABRERA, M., 2002. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest.*, 110(12): 1831-1838.

LEDWITH, B.J.; PAULEY, C.J.; WAGNER, L.K.; ROKOS, C.L.; ALBERTS, D.W.; MANAM, S., 1997. Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem.*, 272: 3707-3714.

LEE, S.H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D., 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 267: 25934-25938.

LEONARD, A.E.; BOBIK, E.G.; DORADO, J.; KROEGER, P.E.; CHUANG, L.T.; THURMOND, J.M.; PARKER-BARNES, J.M.; DAS, T.; HUANG, Y.S.; MUKERJI, P., 2000. Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem*, 3: 765-770.

LEONARD, A.E.; KELDER, B.; BOBIK, E.G.; CHUANG, L.T.; LEWIS, C.J.; KOPCHICK, J.J.; MUKERJI, P.; HUANG, Y.S., 2002. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids*, 37: 733-740

LEONARD, A.E.; PEREIRA, S.L.; SPRECHER, H.; HUANG, Y.S. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 43:36-54.

LEONHARDT, M. Y LANGHANS, W., 2004. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav*, 83(4): 645-651.

LIVAK, K.J., 1997. User Bulletin 2, PE Applied Biosystems.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.

MAIER, J.A.; HLA, T.; MACIAG, T., 1990. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265: 10805-10808.

MARQUARDT, A.; STOEHR, H.; WHITE, K.; WEBER, B.H., 2000. DNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, 66: 175-183

MARTIN-SANZ, P.; CALLEJAS, N.A.; CASADO, M.; DIAZ-GUERRA, M.J.; BOSCA, L., 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in fetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *Br J Pharmacol*, 125: 1313-1319.

MIYAMOTO, T.; OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O., 1976. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, 251(9): 2629-2636.

MIYAZAKI, M.; DOBRZYN, A.; ELIAS, P.M.; NTAMBI, J.M., 2001. Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development. *Proc Natl Acad Sci*, 102(35): 12501-12506.

- MOON, Y.; HAMMER, R.E.; HORTON, J.D., 2008. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J. Lipid Res*, 50(3): 412–423
- MOON, Y.A.; SHAH, N.A.; MOHAPATRA, S.; WARRINGTON, J.A.; HORTON, J.D., 2001. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 276: 45358-45366.
- MORINAGA, S.; YAMAMOTO, Y.; NOGUCHI, Y.; IMADA, T.; RINO, Y.; AKAIKE, M.; SUGIMASA, Y.; TAKEMIYA, S.; KAMEDA, Y.; TAKANASHI, Y., 2002. Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 17(10): 1110-1116.
- MORITA, I., 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandin Other Lipid Mediat.*, 69: 165-175.
- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M.K.; OTTO, J.C.; HORI, T.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L., 1995. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.*, 4: 1065-1067.
- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M.K.; OTTO, J.C.; HORI, T.; SMITH, W.L., 1995. Differential intracellular locations for prostaglandin endoperoxidase H synthetase-1 and -2. *J Biol Chem*, 270: 10902-908.
- NAGANUMA, T.; SATO, Y.; SASSA, T.; OHNO, Y.; KIHARA, A., 2011. Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7. *FEBS Lett.*, 585(20): 3337-41
- NUÑEZ, O.; FERNANDEZ-MARTINEZ, A.; MAJANO, P.L.; APOLINARIO, A.; GOMEZ-GONZALO, M.; BENEDICTO, I.; LOPEZ-CABRERA, M.; BOSCA, L.; CLEMENTE, G.; GARCIA-MONZON, C.; MARTIN-SANZ, P., 2004. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut.*, 53(11): 1665-1672.
- OH C.S.; TOKE, D.A.; MANDALA, S.; MARTIN, C.E., 1997. ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.*, 272: 17376-17384.
- OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMAN, S.L.; OSHUMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, J.M., 1996. Suppression of intestinal polyposis in APC delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, 87: 803-809.
- PARUCH, S.; EL-BENNA, J.; DJERDJOURI, B.; MARULLO, S.; PERIANIN, A., 2006. A role of p44/42 mitogen-activated protein kinases in formyl-peptide receptor-mediated phospholipase D activity and oxidant production. *FASEB J.*, 20 (1): 142–144.
- PATRONO, C., 1994. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*, 330(18): 1287-1294.
- PRESSCOTT, S.M.; MAJERUS, P.W., 1983. Characterization of 1, 2 diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonyl-monoacyl-glycerol intermediate. *J Biol Chem.*, 258: 764-769.
- RIEKE, C.J.; MULICHAK, A.M.; GARAVITO, R.M.; SMITH, W.L., 1999. The role of arginine120 of human prostaglandin endoperoxidase H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem*, 274(24): 17109-17114.

RIENDEAU, P.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FALGUEYRET, J.-P.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; GORDON, R.; GREIG, G.; GRESSER, M.; Guay, J.; KARGMAN, S.; LEÂGER, S.; MANCINI, J.A.; O'NEILL, G.; OUELLET, M.; RODGER, I.W.; THÉÂRIEN, M.; WANG, Z.; WEBB, J.K.; WONG, E.; XU, L.; YOUNG, R.N.; ZAMBONI, R.; PRASIT, P.; CHAN, C.-C., 1997. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, 121: 105-117.

RUSSELL, W.M.S Y BURCH, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London.

SALVEMINI, D., 1997. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci*, 53(7): 576-582.

SAMUELSSON, B., 1963. Isolation and identification of prostaglandins from human seminal and related factors. *J Biol Chem*, 238: 3229-3234.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 12013–12017.

SHANKLIN, J.; SOMERVILLE, C., 1991. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (6): 2510–2514.

SHENG, H.; SHAO, J.; KIRKLAND, S.C.; ISAKSON, P.; COFFEY, R.J.; MORROW, J., 1997. Inhibition of human colon cancer growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 99: 2254-2259.

SIMMONS, D. L.; XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; EVETT, G. E., 1991. *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF*. Plenum Press, pp. 67–78.

SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56(3): 387-437

SIMOPOULOS, A.; LEAF, A.; SALEM, N., 1999. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab*, 43: 127-130.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D. L., 1996. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 271(52): 33157–33160.

SMITH, W.L., 1992. Prostaglandin biosynthesis and mechanism of action. *Am J Physiol*, 268: 181-191.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69: 145-82.

SPRECHER, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys*, 1486: 219-231.

TANABE, T. Y TOHNAI, N., 2002. Cyclooxygenase isozymes and their genes structures and expression. *Prostaglandins Other lipid Mediat*, 68-69: 95-114.

TOKE, D.A. Y Martin C.E., 1996. Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 271: 18413-18422.

- TVRDIK, P.; ASADI, A.; KOZAK, L.P.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B.; JACOBSSON, A., 1997. Cig30, a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 272: 31738-31746.
- TVRDIK, P.; WESTERBERG, R.; SILVE, S.; ASADI, A.; JAKOBSSON, A.; CANNON, B.; LOISON, G.; JACOBSSON, A., 2000. Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J. Cell Biol.*, 149: 707-718.
- VANE, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthase as mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231: 232-235.
- WANG, Y.; BOTOLIN, D.; CHRISTIAN, B.; BUSIK, J.; XU, J.; JUMP, D.B., 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lipid Res.*, 46: 706-715
- WANG, Y.; BOTOLIN, D.; XU, J.; CHRISTIAN, B.; MITCHELL, E.; JAYAPRAKASAM, B.; NAIR, M.; PETERS, J.M.; BUSIK, J.; OLSON, L.K. 2006. Regulation of hepatic fatty acid elongase and Desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res*, 47: 2028-2041.
- WANG, Y.; TORRES-GONZALEZ, M.; TRIPATHY, S.; BOTOLIN, D.; CHRISTIAN, B.; JUMP, D.B., 2008. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 (elovl-5) activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *J. Lipid Res.*, 49(7): 1538-1552.
- WITWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.R., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22: 130-138.
- XIAO, G.; CHEN, W.; KULMACZ, R.J., 1998 Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*, 273(12): 6801-6811
- YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K. I.; KAUFMANN, W. E.; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F., 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11: 371-386.
- YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K. I.; KAUFMANN, W. E.; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F., 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11: 371-386.
- YAMAMOTO, H.; KONDO, M.; NAKAMORI, S.; NAGANO, H.; WAKASA, K.; SUGITA, Y.; CHANG-DE J.; KOBAYASHI, S.; DAMDINSUREN, B.; DONO, K.; UMESHITA, K.; SEKIMOTO, M.; SAKON, M.; MATSUURA, N.; MONDEN, M., 2003. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis¹. *Gastroenterology*, 125(2): 556-571.
- YOKOYAMA, C. Y TANABE, T., 1989. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 165: 888-894.
- YUAN, C.; RIEKE, C.J.; RIMON, G.; WINGERD, B.A.; SMITH, W.L., 2006. Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers. *Proc Natl Acad Sci*, 103(16): 6142-6147
- YUE, X.; YANG, F.; YANG, Y.; MU, Y.; SUN, W.; LI, W.; XU, D.; WU, J.; ZHU, Y., 2011. Induction of cyclooxygenase-2 expression by hepatitis B virus depends on demethylation-associated recruitment of transcription factors to the promoter. *Virology*, 8: 118.
- ZHANG, M.Z.; WANG, J.L.; CHENG, H.F.; HARRIS, R.C.; MCKANNA, J.A., 1997. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol.*, 273(6 Pt 2): 994-1002.