



MEMORIA CIENTÍFICA

AYUDAS PREDOCTORALES

TÍTULO DEL PROYECTO

Identificación de marcadores metabólicos en cáncer colorrectal. Análisis lipidómico de la respuesta inflamatoria de macrófagos asociados a tumor

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Juan González Valdivieso

CENTRO

Instituto de Biología y Genética Molecular (CSIC)

DIRECTOR DEL PROYECTO/JEFE DE GRUPO

Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Es imprescindible limitar el número de páginas de la memoria a 5 como máximo.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO DEL PROYECTO: **Identificación de marcadores metabólicos en cáncer colorrectal. Análisis lipídómico de la respuesta inflamatoria de macrófagos asociados a tumor**

PALABRAS CLAVE: Inmunidad innata, inflamación, transducción de señal, metabolismo lipídico, macrófagos asociados a tumor, HMGB1, lipidoma, espectrometría de masas

DURACIÓN: 36 meses

CLASIFICACIÓN:

Básica	<input type="checkbox"/>
Clínica	<input type="checkbox"/>
Traslacional	<input checked="" type="checkbox"/>
Epidemiológica	<input type="checkbox"/>
otros (especificar)	<input type="checkbox"/>

NOMBRE DEL CENTRO: Instituto de Biología y Genética Molecular (CSIC)

DIRECCIÓN POSTAL: C/Sanz y Forés, N°3, 47003, Valladolid

TELÉFONO: 983186494

FAX: 983184800

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES METABÓLICOS EN CÁNCER COLORRECTAL. ANÁLISIS LIPIDÓMICO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR

1.-Resumen

La ausencia de marcadores robustos y fiables para la detección precoz del cáncer de colon hace que se detecte generalmente en estadios avanzados, y consiguientemente, su tasa de mortalidad sea muy elevada.

Dado que existen fuertes evidencias de que los lípidos de la dieta, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, son inmunomoduladores de los procesos relacionados con el desarrollo tumoral, así como, desde el punto de vista bioquímico son precursores de mediadores de carácter lipídico que señalizan en dichos procesos, parece claro que el uso de la lipidómica (estudio de los lípidos celulares por espectrometría de masas así como de las enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis y regulación de los mismos) es de especial interés como herramienta para encontrar marcadores metabólicos que nos permitan el diagnóstico y clasificación de tumores, así como el entendimiento de la regulación bioquímica, mediada por lípidos, de los procesos relacionados con el desarrollo de los mismos.

Así mismo el estudio del lipidoma de macrófagos asociados a tumor se presenta como un interesante objetivo, pues son células de amplia variabilidad fenotípica y funcional, que en estados iniciales del tumor se comportan de forma proinflamatoria, promoviendo la fagocitosis de las células tumorales, mientras que en estados avanzados promueven una actividad antiinflamatoria que ayuda a la supervivencia y diseminación del tumor. Esos cambios se deben a que los macrófagos poseen un metabolismo lipídico enormemente activo, pudiendo liberar en estado de activación mediadores lipídicos con distinta actividad biológica de gran importancia en los procesos neoplásicos.

Este trabajo propone una aproximación metabolipidómica al desarrollo del cáncer colorrectal que nos permita encontrar marcadores de presencia y estadio tumoral mediante el estudio directo de los metabolitos que intervienen en los procesos relacionados, especialmente aquellos de origen lipídico. Además se estudiarán las rutas metabólicas que controlan la producción y homeostasis de estos metabolitos con el objetivo ideal de buscar dianas terapéuticas para el tratamiento de ésta enfermedad.

2.-Antecedentes y estado actual del tema:

A pesar de que el cáncer colorrectal (CRC) se desarrolla en varias etapas, proporcionando una oportunidad para la detección precoz, la mayoría de los pacientes se diagnostican en estado avanzado. De hecho, el pronóstico no ha mejorado sustancialmente en los últimos años y en la actualidad el único marcador de detección temprana de CRC es el FOBT (fecal occult blood test) y el único marcador aceptable de pronóstico es el antígeno carcinoembrionario (CEA). Estos marcadores no poseen la suficiente sensibilidad y especificidad, y por eso cada vez es más necesario delinear nuevos biomarcadores fieles y robustos que permitan la detección, diagnóstico y clasificación de tumores, así como el seguimiento y la evaluación del pronóstico, la ampliación del conocimiento y su aplicación a la terapia. En la actualidad este propósito es posible gracias al desarrollo de la biología de sistemas que adopta un enfoque integral, estudiando globalmente las partes de un conjunto dinámico, como puede ser el tumor, y cuya aplicación práctica se refleja en las ciencias "ómicas" (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). De todas ellas la metabolómica/lipidómica tiene una clara ventaja, pues se centra en el estudio directo de los metabolitos que son el resultado final de la respuesta de los sistemas biológicos ante cambios en el genoma, transcriptoma, proteoma o ambiente. Luego, con esta aproximación, pasamos de buscar marcadores concretos del desarrollo de la enfermedad a buscar huellas metabólicas que surgen como cambios de todo el sistema, que nos permitan su detección, pronóstico y prevención.

Hace décadas que se conoce la gran importancia de los lípidos en cáncer, al descubrir que las células neoplásicas son capaces de sintetizar lípidos de una manera similar a los tejidos embrionarios y que las células tumorales reactivan la síntesis lipídica de novo, algo que no ha de extrañar dado que para generar nuevas células durante la tumorigénesis es indispensable fabricar lípidos para la nueva membrana celular. Además se ha comprobado que las células tumorales poseen un mayor número de cuerpos lipídicos y que son sitios de síntesis de mensajeros lipídicos claves en la transformación tumoral.

Los lípidos están entre las biomoléculas celulares menos entendidas a pesar de las múltiples y esenciales funciones que desempeñan (además de almacén de energía, participan en transducción de señal, homeostasis de membranas celulares y son segundos mensajeros) de modo que los desequilibrios producidos en las rutas de señalización gobernadas por estos mediadores lipídicos favorecen la progresión de enfermedades de carácter crónico-inflamatorio, autoinmunes o el cáncer. Debido a la interconexión entre ellas es más correcto hablar de redes de señalización que de rutas aisladas, por ello, los desequilibrios homeostáticos en la célula tumoral que dan lugar a situaciones fisiopatológicas afectan a varias rutas de señalización y la complejidad de su estudio se supera gracias al desarrollo de la lipidómica, que constituye la completa investigación molecular y cuantitativa de los lípidos. El desarrollo de la lipidómica ha sido posible gracias a los grandes avances que se han producido en espectrometría de masas (MS) en las últimas décadas y que permiten no sólo estudiar el lipidoma celular en situaciones estáticas, sino abarcar el conocimiento de rutas lipídicas y su relación con expresión de genes y proteínas.

Cada vez hay más evidencia de que la dieta y la nutrición son factores clave como modificadores de la carcinogénesis, y que ciertos componentes influyen en el riesgo de desarrollar cáncer, principalmente cánceres digestivos como el CRC. En particular, los lípidos han sido el foco de atención de muchas investigaciones, debido a que datos epidemiológicos indican una relación entre la ingesta de lípidos en la dieta y la carcinogénesis de colon; de hecho hay una creciente evidencia clínica y epidemiológica que muestra a los ácidos grasos omega 3 como protectores frente al cáncer de colon y a los ácidos grasos omega 6, entre los que se incluye el ácido araquidónico (AA), como inductores del mismo. Ese papel del AA en cáncer se debe en parte a su potencial proinflamatorio, pues es precursor de metabolitos oxigenados, colectivamente denominados eicosanoides, que participan en procesos directamente relacionados con el desarrollo del cáncer como proliferación celular, supervivencia, movilidad, vascularización de tejido o regulación inmune; luego, perturbaciones en la normal homeostasis del AA o en las rutas de producción de eicosanoides, pueden provocar el crecimiento del tumor y su metástasis. Por ello, el conocimiento exhaustivo de las reacciones metabólicas en las que participa el AA (incorporación, remodelación y liberación de los fosfolípidos celulares bajo estimulación celular) es de vital importancia, pues limita su disponibilidad para la síntesis de eicosanoides.

High Mobility Group Protein B1 (HMGB1) es una proteína presente en prácticamente todas las células eucariotas que cumple funciones muy variadas, bien unida a DNA facilitando la unión de factores de transcripción, o bien disociada de la cromatina en células dañadas puede liberarse al medio extracelular actuando como un marcador de daño celular, desencadenando la respuesta inmune. Además pueden unirse a múltiples receptores expresados en células inmunes, a PAMPs y a IL1. Es liberado por macrófagos cuando son activados por señales extracelulares o por fagocitosis, por ello clásicamente se la ha considerado como un mediador proinflamatorio porque se libera en caso de daño estéril o infección.

Esta proteína ha cobrado gran interés al observarse su papel central en el desarrollo oncogénico conjuntamente con la respuesta inflamatoria, pues se ha demostrado que el aumento de su expresión se asocia con

varios sellos distintivos del cáncer, activando rutas de señalización que implican a AKT, MAPK y NF- κ B, que juegan papeles importantes en el crecimiento tumoral. Ese aumento de expresión también se relaciona con la polarización de macrófagos, células con una gran plasticidad fenotípica y funcional que en estado activado liberan mediadores lipídicos que favorecen procesos clave en el desarrollo del tumor como proliferación y angiogénesis, y que bajo la influencia de HMGB1 se polarizan de M2 (actividad de reparación y resolución de la inflamación) a M1 (actividad proinflamatoria, citotóxica y microbicida), lo cual se refleja en el hecho de que en las fases tempranas de un proceso tumoral, los macrófagos asociados a tumor (TAM) exhiben marcada actividad proinflamatoria y antitumoral, que con el tiempo se transforma en antiinflamatoria, contribuyendo a favorecer la supervivencia del tumor y su diseminación. Por tanto, el estudio lipidómico de TAM polarizados por HMGB1 permitiría detectar especies lipídicas concretas producidas por la polarización con HMGB1, lo que tiene gran relevancia patofisiológica, pues ayudaría a encontrar rutas metabólicas específicas sobre las que actúa HMGB1 que son responsables de la respuesta pro- o antiinflamatoria del macrófago dentro del tumor.

3.-Objetivos

Objetivo I) Perfil lipidómico global de tejido de tumor de CRC: Se analizará el perfil lipídico mediante MS (ver métodos) de tejido tumoral no necrosado, prestando especial atención a aquellos lípidos implicados en el metabolismo de AA, y se comparará con mucosa normal del mismo paciente, en busca de especies lipídicas que sirvan de biomarcadores de presencia y de estadio del tumor. Analizando un gran número de muestras se podrán establecer huellas moleculares lipídicas fiables asociadas a tumor y, en función de las muestras disponibles, patrones característicos de tumores irradiados o sometidos a quimioterapia, estableciendo de esta manera las rutas lipídicas que están activadas o desactivadas en la tumorigénesis y cómo pueden ser afectadas.

Objetivo II) Cambios en la expresión de genes de los grupos de enzimas implicados en el control de los niveles de AA en tumor de CRC: Se analizarán mediante Q-PCR los niveles de expresión de los genes que codifican para los grupos de enzimas implicados en la regulación de los niveles de AA. La cuantificación será relativa, por lo que los niveles se compararán con los niveles expresados en mucosa normal. El propósito es identificar, a través de las diferencias observadas en las especies lipídicas entre tumor y mucosa normal, rutas metabólicas que estén alteradas en tumor.

Objetivo III) Análisis lipidómicos de TAM de CRC en estado basal: Se analizará el perfil lipídico mediante MS de TAM extraídos de tumor colorrectal de forma análoga al objetivo 1. Los datos obtenidos se correlacionarán con el estadio del tumor. Este objetivo resultará especialmente útil para la identificación de especies lipídicas propias del estadio del tumor o tratamiento recibido y que de cuenta del ambiente pro- o anti-inflamatorio específicamente promovido por los macrófagos presentes en el tumor.

Objetivo IV) Análisis del contenido basal de HMGB1 en el tumor por ELISA: Se analizará mediante ensayo ELISA los niveles de HMGB1 en la masa tumoral. Con este objetivo se pretende correlacionar los niveles de proteína encontrados en la masa tumoral con los perfiles lipidómicos y justificar lo propuesto en los objetivos 5 y 6

Objetivo V) Análisis metabolipidómicos de TAM polarizados por HMGB1: Los TAM se incubarán con HMGB1 recombinante a distintas concentraciones y a diferentes tiempos (0-48 h) se estudiará el perfil lipídico, poniendo especial atención en el metabolismo de AA. Diferencias observadas respecto a TAM sin tratar proporcionará información de cómo HMGB1 modifica el comportamiento (polarización) del macrófago, si actúa de manera anti o proinflamatoria (favorece o no la progresión del tumor) y si hay moléculas lipídicas que varíen por acción de HMGB1 y que sean responsables de su efecto. El contenido de AA en fosfolípidos se medirá por MS de forma análoga al objetivo 1, además se realizarán análisis de esfingolípidos, pues alguno de ellos son moléculas bioactivas importantes en el cáncer. Nótese que la realización de este objetivo se apoya en la línea de investigación del grupo receptor en macrófagos polarizados derivados de sangre periférica, donde está bien definido el perfil lipídico de cada tipo de macrófago, con lo que se puede hacer una comparativa con los resultados obtenidos con TAM polarizados con HMGB1.

Objetivo VI) Cambios en la expresión de genes de los grupos de enzimas implicados en el control de los niveles de AA en TAM polarizados por HMGB1: Análogo al objetivo 3 se analizarán mediante Q-PCR los niveles de expresión de los genes que codifican para los grupos de enzimas implicados en la regulación de los niveles de AA en TAM estimulados con HMGB1 en comparación con TAM sin estimular. Así se podrán identificar rutas metabólicas específicas que den cuenta de las variaciones lipídicas encontradas, estableciendo posibles dianas moleculares donde actúa HMGB1. Se podrá determinar si la secreción de HMGB1 en un ambiente tumoral modifica el carácter pro- o anti-inflamatorio del mismo a través de la modificación de alguna de las rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de AA.

4.-Metodología

Este trabajo se desarrollará en colaboración con los doctores Juan Beltrán de Heredia e Íñigo López de Cenarruzabeitia, jefe de servicio y adjunto, respectivamente, del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Los especímenes de resección de CRC, pasarán al Servicio de Anatomía Patológica donde serán procesados y etiquetados de acuerdo con su diagnóstico anatomopatológico. De cada paciente, previamente informado y consentida su inclusión en la investigación, se obtendrán dos muestras correspondientes a tejido tumoral y a mucosa normal seccionada a 15 cm aproximadamente de 1-2 cm³. Se estima que se dispondrá de un tumor semanal.

Extracción de TAM: La pieza de tumor se mantendrá en solución HBSS a 4 °C, se cortará en pequeños trozos de 1-2 mm³ y se incubará durante 60 min a 37 °C con agitación en un volumen equivalente de colagenasa tipo IV al 2%

v/v y DNasa I en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y 40 µg/ml de gentamicina. El tejido semidigerido se filtrará en mallas de nylon de 100 µm. Las células se plaquearán en placas Petri en medio incompleto RPMI. Se incubará durante 1 h y se lavan las células con el fin de eliminar células no adherentes.

Análisis de expresión de genes: Actualmente el grupo receptor ha puesto a punto la Q-PCR, con especial experiencia en la evaluación de los niveles de enzimas de metabolismo de AA así como de marcadores de activación de macrófagos pro-M1 y M2. La extracción de mRNA se hará según el método de Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se sintetizará gracias a la retrotranscriptasa M-MLV siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Ambion). La Q-PCR se realizará en un equipo Applied Biosystems 7500 Real Time PCR utilizando el kit comercial Brilliant III Ultra-Fast SYBR ® Green QPCR Master Mix siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). El diseño de cebadores se llevará a cabo en PrimerBank.

Estrategias lipídicas: En todos los casos, bien el tumor congelado y previamente homogeneizado con un politrón, o bien los TAM raspados de las placas, se sonicarán y se guardará una porción para medir proteína. Los lípidos totales se extraerán mediante el procedimiento de Bligh&Dyer previamente a su análisis por espectrometría de masas. En cada caso se añadirá un estándar interno de especies no endógenas para cuantificar.

El equipamiento del que se dispone consiste en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TQ) API2000 (Applied Biosystems) acoplado a un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Series200 (Perkin Elmer) y un cromatógrafo de gases Agilent 6890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C (GC-MS). Además se tiene acceso a un espectrómetro de masas de trampa iónica (IT) Bruker esquire6000 acoplado a un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Hitachi Lachrom Elite HPLC (Merck). El laboratorio también dispone de un aparato CAMAG TLC-MS Interface para realizar análisis rápidos de especies lipídicas sin necesidad de poner a punto métodos de separación por HPLC. Con

este equipamiento se pueden abordar los análisis lipídicos que se proponen en este proyecto con la suficiente sensibilidad, precisión y rapidez. Tanto el solicitante como el grupo receptor poseen la experiencia suficiente en el uso de aparatos de MS, estandarizando métodos y procedimientos con el fin de identificar y cuantificar lipídomas celulares.

El análisis de ácidos grasos presentes en lípidos neutros (mono-, di-, triacilglicerol y ésteres de colesterol) se llevará a cabo mediante GC-MS tras previamente separar las distintas clases de lípidos por cromatografía en capa fina (TLC) y convertir sus ácidos grasos en ésteres metílicos.

La cuantificación de especies de fosfolípidos, en especial aquellas que contienen AA, se realizará mediante HPLC-TI usando para la separación cromatográfica una columna Supelcosil LC-18 en fase reversa. Las especies de fosfatidilcolina (PC) se monitorizarán como iones positivos $[M+H]^+$, mientras que el resto de especies de fosfolípidos (PE, PI, PS, PG) se monitorizarán como iones negativos $[M-H]^-$.

El análisis cualitativo complementario de especies de fosfolípidos se realizará mediante HPLC-TQ, usando para la separación cromatográfica una columna Supelcosil LC-Si en fase normal. Para la identificación de cada familia de especies por triple cuadrupolo se trabajará en modo precursor ion (+184) para PC, neutral loss (+141) para PE, precursor ion (-241) para PI, neutral loss (+185) para PS, precursor ion (-153) para PA, precursor ion (-321) para PIP y precursor ion (-401) para PIP₂. Las especies de fosfolípidos que contienen AA se identificarán trabajando en modo precursor ion (-303).

El análisis de lisofosfolípidos se realizará mediante HPLC-IT trabajando en cromatografía de fase normal. La extracción previa de lisofosfolípidos se hará con butanol previamente acidificando la muestra con HCl 0,3 M.

La extracción de eicosanoides se llevará a cabo directamente sobre el sobrenadante celular con hexano/acetato de etilo (1:1). Su análisis se llevará a cabo mediante HPLC-TQ, separando los distintos eicosanoides con un protocolo de cromatografía en fase reversa y configurando el triple cuadrupolo para trabajar en modo múltiple reaction monitoring (MRM), monitorizando las transiciones de ión padre a un fragmento específico para cada eicosanoide.

El análisis de ceramidas se hará mediante CAMAG-TQ, separando las ceramidas del resto de lípidos celulares mediante TLC, eluyéndolas con acetato de amonio 5 mM en metanol y monitorizándolas en el triple cuadrupolo trabajando en modo precursor ion (+264) para esfingosina y (+266) para dihidroesfingosina.

El análisis de esfingosina, esfingosina-1-fosfato y ceramida-1-fosfato se llevará a cabo mediante HPLC-TQ previamente separando las especies mediante cromatografía en fase reversa.

5.-Plan de trabajo. Cronograma

Hay que entender que debido a la gran heterogeneidad de los tumores que se analizarán, es conveniente llevar a cabo todos los análisis propuestos en todos y cada uno de ellos para poder encontrar no sólo marcadores o rutas metabólicas determinadas en tumores respecto a mucosa normal, sino también para poder encontrar marcadores que nos permitan clasificar tanto el tipo de tumor como su estadio o los posibles cambios debidos al tratamiento.

Gracias a la amplia experiencia del laboratorio receptor en el uso de la espectrometría de masas en lipidómica y en la medida de la expresión de genes que codifican para proteínas de interés en el metabolismo de AA, parece claro que el primer objetivo será estandarizar la homogeneización del tejido de adenocarcinoma de colon que nos proveen así como la extracción de TAM, trabajo que se está llevando a cabo ya por el grupo receptor y que se seguirá optimizando en paralelo a los análisis propuestos.

Dentro de las técnicas analíticas que se van a llevar a cabo con cada tumor el primer paso es la medida de la proteína HMGB1 en cada tumor, lo cual supondrá no más de un 5% del tiempo dedicado al estudio de cada tumor, pues se hará siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

En lo referido a los análisis lipidómicos, tanto de la propia masa tumoral como de los TAM, hay que diferenciar entre el estudio de ácidos grasos de lípidos neutros y de especies de fosfolípidos conteniendo AA que ya está perfectamente puesto a punto por el laboratorio receptor y por ello sólo ocupará el 30% del tiempo destinado a esta tarea; sin embargo el análisis de eicosanoides y algunos esfingolípidos aún ha de ser puesto a punto y por ello se le dedicará el 40% restante.

La medida de expresión de genes codificantes de enzimas de interés en el metabolismo de AA por qPCR ha sido puesta a punto para macrófagos M1 y M2 polarizados in vitro y se le dedicará un 25% del tiempo de trabajo.

La puesta en común de datos y comparativa entre los tumores se realizará tras tener un número significativo de muestras, suficientes para poder tener resultados significativos que trasladar al terreno clínico.

6.-Importancia del trabajo en oncología

El cáncer colorrectal es uno de los más comunes entre la población de los países desarrollados, causando más de 600.000 muertes anuales. Una detección precoz del CRC hace que la tasa de supervivencia sea mayor del 70% a 5 años, sin embargo cuando esta enfermedad es detectada en estadios avanzados la tasa de supervivencia es menor de un 10%; luego el descubrimiento de marcadores robustos y eficaces para su diagnóstico parece clave a la hora de evaluar el mismo y aplicar los conocimientos obtenidos para una futura terapia.

La evidente implicación de los lípidos de la dieta en el desarrollo del CRC, así como su clara componente inflamatoria hacen que la lipidómica se presente como la herramienta clave en el estudio de aquellos metabolitos de origen lipídico directamente relacionados con aspectos del desarrollo tumoral como proliferación o angiogénesis y que permitirá buscar metabolitos que se presenten alterados en los procesos neoplásicos con el objetivo de establecerlos como marcadores de CRC. Igualmente el estudio de las rutas metabólicas que dan lugar a esos metabolitos nos permitirá establecer relaciones entre la incorrecta homeostasis celular y el desarrollo del tumor, estableciendo el contexto bioquímico global en el que las células modulan el crecimiento y desarrollo tumoral a través de los lípidos que sintetizan, contexto que puede ser utilizado para el posterior descubrimiento de dianas terapéuticas.

El hecho de establecer una colaboración con el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid hace que se disponga de un punto de vista clínico y epidemiológico complementario, de gran interés a la hora de conectar los datos obtenidos con el diagnóstico, seguimiento, estadio, prevención y terapia de los pacientes con esta enfermedad.

Referencias:

1. Santos, C. R. and Schulze, A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J.*
2. Chapkin, R. S., McMurray, D. N., and Lupton, J. R. 2007. Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23: 48-54.
3. Nkondjock, A., Shatenstein, B., Maisonneuve, P., and Ghadirian, P. 2003. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect. Prev.* 27: 55-66.
4. Ricciotti, E. and FitzGerald, G. A. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 986-1000.
5. Buhmeida, A., Bendardaf, R., Hilska, M., Laine, J., Collan, Y., Laato, M., Syrjanen, K., and Pyrhonen, S. 2009. PLA₂ (group I phospholipase A₂) as a prognostic determinant in stage II colorectal carcinoma. *Ann. Oncol.* 20: 1230-1235.
6. Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., and DuBois, R. N. 1994. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107: 1183-1188.
7. Nakanishi, M. and Rosenberg, D. W. 2006. Roles of cPLA₂α and arachidonic acid in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 13-1343.

