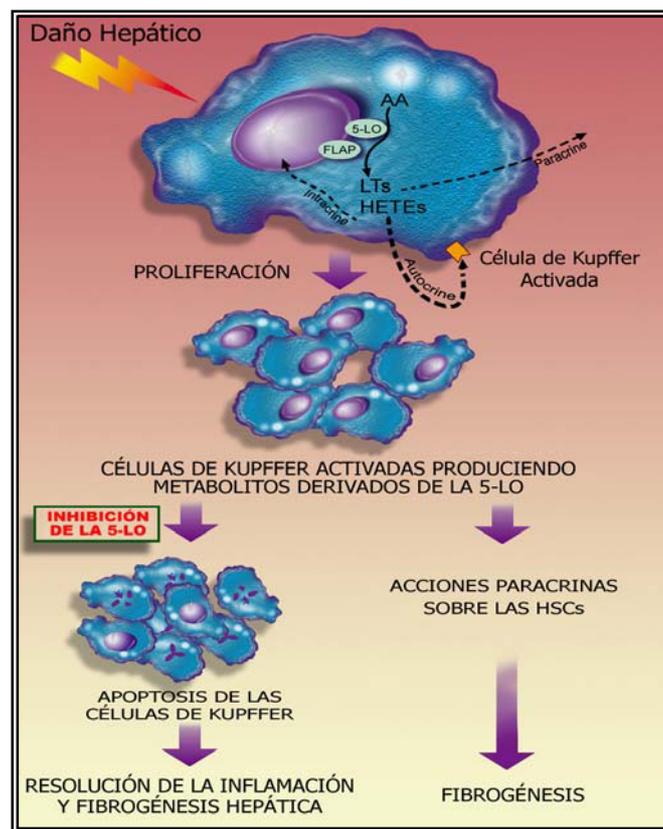


UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

BIOSÍNTESIS DE MEDIADORES LIPÍDICOS DERIVADOS DE LA 5-LIPOOXIGENASA EN EL SINUSOIDE HEPÁTICO. IMPLICACIONES EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA.



ESTHER TITOS RODRÍGUEZ

Barcelona, 2004

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Biologia

BIOSÍNTESIS DE MEDIADORES LIPÍDICOS DERIVADOS DE LA 5-LIPOOXIGENASA EN EL SINUSOIDE HEPÁTICO. IMPLICACIONES EN LA FIBROGÉNESIS HEPÁTICA.

Memoria presentada por

ESTHER TITOS RODRÍGUEZ

para optar al título de Doctora en Biología

Trabajo realizado bajo la dirección del **Dr. Joan Clària Enrich**, en la Unitat de DNA del Hospital Clínic de Barcelona

Esther Títos Rodríguez

Dr. Joan Clària Enrich
Director

Dr. Francesc López Soriano
Tutor

Tesis inscrita en el programa de doctorado *Bioquímica i Biologia Molecular*, del departamento de Bioquímica i Biologia Molecular, bienio 1995-1997

Estas páginas, 8 años de trabajo, están dedicadas a

Jose María Vázquez Cordero, Txemita

ABREVIATURAS

A431	Línea celular humana de carcinoma epidérmico
AA	Ácido araquidónico
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BL41-E95A	Línea celular de linfoma de Burkkit
BLT ₁ /BLT ₂	Receptores de membrana 1 y 2 del LTB ₄
C5a	Complemento C5a
CC-1	Línea celular de hepatocitos de rata
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CHO	Línea celular de ovario de hamster chino
COS	Línea de células renales de mono
COX	Ciclooxigenasa
CRL-2192	Línea celular de macrófagos alveolares de rata
Cys-LT ₁ /Cys-LT ₂	Receptores de membrana 1 y 2 de los cisteinil-LTs
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DMSO	Dimetilsulfóxido
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin</i>
FLAP	Proteína activadora de la 5-lipooxigenasa
GGL	γ-glutamil leucotrienasa
GGT	γ-glutamil transpeptidasa
GM-CSF	Factor estimulador del crecimiento de colonias de granulocitos/macrófagos
HEK 293	Línea de células renales embrionarias humanas
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HL60	Línea celular humana de leucemia promielocítica
HODE	Ácido hidroxioctadecadienoico
HPETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HPODE	Ácido hidroperoxioctadecadienoico
HSC	Células hepáticas estrelladas
HUVEC	Células endoteliales humanas del cordón umbilical
IC ₅₀	Concentración de fármaco que inhibe al 50%

IL	Interleuquina
INF γ	Interferón γ
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
kDa	kiloDalton
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LO	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBD	Dipeptidasa ligada a membrana
M-CSF	Factor estimulador del crecimiento de colonias de macrófagos
MGSTs	Glutación <i>S</i> -transferasas microsomales
MK, MAPKAP quinasa	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase</i>
MM6 (Mono Mac 6)	Línea celular de monocitos humanos
MMP-2	Metaloproteinasa 2, gelatinasa A
NIH-3T3	Línea celular de fibroblastos de ratón
NLS	Secuencias de localización nuclear
NPC	Células hepáticas no parenquimales
NO	Óxido nítrico
PIIINP	<i>Amino-terminal propeptide of type III procollagen</i>
PICP	Procolágeno tipo I
PAF	Factor activador de plaquetas
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
PhGPx	<i>Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase</i>
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinasa/serina-treonina proteín quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
cPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica
PMA	Forbol-miristato-acetato
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RAW	Línea celular de macrófagos murinos
RBL-2H3	Línea celular de leucemia basofílica/mastocitaria humana

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Retrotranscripción
SEC	Células endoteliales de los sinusoides hepáticos
SRS-A	<i>Slow reacting substance of anaphylaxis</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
THP-1	Línea celular humana de leucemia monocítica
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases I</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TX	Tromboxano
U937	Línea celular humana de histiocitos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN*página*

I. Metabolismo del ácido araquidónico. Lipooxigenasas	1
1. Introducción al metabolismo del ácido araquidónico	1
2. Vía de las lipooxigenasas	2
2.1. 12-Lipooxigenasa (12-LO)	5
2.2. 15-Lipooxigenasa (15-LO)	7
2.3. 5-Lipooxigenasa (5-LO)	8
II. Características moleculares de la 5-LO	9
1. El gen de la 5-LO y la regulación de su expresión proteica	9
2. Reacciones catalizadas por la 5-LO	11
3. Factores estimuladores de la actividad enzimática	12
4. Proteína activadora de la 5-LO (FLAP)	15
5. Localización subcelular de la 5-LO	17
6. Interacción con otras proteínas	22
7. Regulación de la actividad de la 5-LO	25
7.1. Incremento del Ca ²⁺ intracelular	25
7.2. Fosforilación de la 5-LO	27
8. Inhibidores endógenos de la vía de la 5-LO	30
III. Actividad biológica de los eicosanoides derivados de la 5-LO	32
1. Receptores de los LTs	33
1.1. Receptores del LTB ₄	33
1.2. Receptores de los cisteinil-LTs	35
2. Acciones biológicas de los cisteinil-LTs	39
2.1. Contracción del músculo liso de las vías respiratorias	40

2.2. Acciones vasoactivas en el músculo liso	
de territorios extrapulmonares	41
2.3. Efectos cardiovasculares	42
2.4. Remodelado tisular e inflamación	43
2.5. Otros efectos de los cisteinil-LTs	46
3. Inhibición farmacológica de la biosíntesis de LT	48
3.1. Inhibición por disponibilidad de sustrato	48
3.2. Inhibición directa de la actividad 5-LO	49
3.3. Inhibición de la FLAP	52
4. Estudios con ratones modificados genéticamente (ratones <i>knockout</i>)	54
4.1. Deficiencia del gen de la 5-LO	55
4.2. Deficiencia del gen de la FLAP	57
4.3. Deficiencia del gen de la LTA ₄ hidrolasa	58
4.4. Deficiencia del gen de la LTC ₄ sintasa	59
4.5. Deficiencia del gen de la γ -glutamil transpeptidasa (GGT)	
y γ -glutamil leucotrienasa (GGL)	60
4.6. Deficiencia del gen de la dipeptidasa ligada a membrana (MBD)	61
4.7. Deficiencia en el gen del receptor de cisteinil-LTs, Cys-LT ₁	61
5. Nuevas implicaciones de la 5-LO	62
5.1. Proliferación celular y cáncer	62
5.2. Osteoporosis	65
5.3. Arteriosclerosis	66
IV. Enfermedad hepática crónica	67
1. Aspectos generales. Eicosanoides y enfermedad hepática	67
2. Alteraciones intrahepáticas	70

2.1. Fibrosis hepática	70
2.2. Hipertensión portal	72
2.3. Patogénesis: inflamación y fibrosis	75
3. El sinusoides hepático	77
3.1. La célula de Kupffer	79
3.1.1. Características morfológicas	79
3.1.2. Características funcionales	81
3.1.3. Heterogeneidad funcional y morfológica	83
3.1.4. Origen y cinética de las células de Kupffer	84
3.1.5. Papel de la célula de Kupffer en la lesión hepática	86
<u>OBJETIVOS</u>	91
<u>RESULTADOS</u>	95
1. Artículo 1: Los cisteinil-LTs producidos por los hepatocitos modulan el tono vascular hepático en la cirrosis experimental	95
<i>Hepatocyte-Derived Cysteinyl Leukotrienes Modulate Vascular Tone in Experimental Cirrhosis. Títos E., Clària J., Bataller R., Bosch-Marcé M., Ginès P., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., and Rodés J. Gastroenterology 2000;119:794-805.</i>	
2. Artículo 2: La inhibición de la 5-lipooxigenasa induce la apoptosis de las células de Kupffer: implicaciones en la fibrosis hepática	111
<i>Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. Títos E., Clària J., Planagumà A., López-Parra M., Villamor N., Párrizas M., Carrió A., Miquel R., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., and Rodés J. FASEB J. 2003;17(12):1745-7.</i>	
3. Anexo al artículo 2	147

<u>DISCUSIÓN</u>	153
<u>CONCLUSIONES</u>	165
<u>APÉNDICE 1: Material y Métodos</u>	171
<u>APÉNDICE 2: Publicaciones derivadas de este trabajo</u>	197
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	201

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo del AA	2
Figura 2: Biosíntesis de los derivados del AA producidos por la acción de la 5-, 12- y 15-LO	3
Figura 3: Formación del hidroperóxido (HPETE)	4
Figura 4: Biosíntesis y papel funcional de los mediadores lipídicos derivados de la actividad 5-LO, 5(S)-HETE y LTs	9
Figura 5: Localización subcelular de la 5-LO	19
Figura 6: Activación celular de la 5-LO y síntesis de LTs	29
Figura 7: Factores celulares que influyen sobre la actividad 5-LO	32
Figura 8: Patogénesis de la enfermedad hepática crónica	76
Figura 9: Células del sinusoides hepático	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características básicas de los receptores de membrana del LTB ₄	34
Tabla 2: Características básicas de los receptores de membrana de los cisteinil-LTs	36

INTRODUCCIÓN

I. Metabolismo del ácido araquidónico. Lipooxigenasas

1. Introducción al metabolismo del ácido araquidónico

Los eicosanoides (del griego *eicosa* = “veinte”) engloban toda una serie de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico (AA), ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono. Entre ellos se encuentran compuestos de potente actividad biológica como las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), prostaciclina, leucotrienos (LTs) y lipoxinas. El AA es el precursor de eicosanoides más abundante en el ser humano, se ingiere en la dieta o se deriva de la metabolización de dos ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico. El AA se almacena formando parte de los glicerofosfolípidos de membrana, esterificado principalmente en la posición sn-2 y se libera junto al lisofosfolípido correspondiente en respuesta a distintos estímulos físicos, químicos o mecánicos que pueden variar de un tipo celular a otro (1). En respuesta a estos estímulos se activan varias fosfolipasas en concreto, la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (2) que libera el AA de las membranas celulares. De entre las diferentes isoformas existentes de esta enzima, la PLA₂ citosólica (cPLA₂) (grupo IV) es la que está principalmente involucrada en la liberación de AA (3). La concentración de AA libre intracelular en estado de reposo es muy baja y está controlada parcialmente por dos actividades enzimáticas que lo reincorporan a los lípidos de membrana: la araquidonil-CoA sintasa y la araquidonil-CoA transferasa. La primera realiza la esterificación del ácido graso con el coenzima-A y la segunda añade el éster CoA a la posición sn-2 de un lisofosfolípido que suele ser la lisofosfatidilcolina o el lisofosfatidilinositol (1,4). Sin embargo, las características moleculares del AA y en particular la presencia de cuatro dobles enlaces en posición *cis* lo hacen susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno. Esto puede ocurrir de manera

no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos, o a través de la acción de tres tipos de oxigenasas: las ciclooxigenasas (COX) que dan lugar a compuestos como las PGs y los TXs, la lipooxigenasas (LO) que dan lugar a los ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) y a los LTs y las epoxigenasas o citocromos P450 que originan ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e isómeros de los HETEs (ver *Figura 1*). Estas diferentes vías de señalización celular se encuentran distribuidas de forma variable entre los diferentes tipos celulares y se activan en respuesta a estímulos de naturaleza variada transformando el AA a eicosanoides, metabolitos que ejercen potentes acciones biológicas muy localizadas y de amplio espectro.

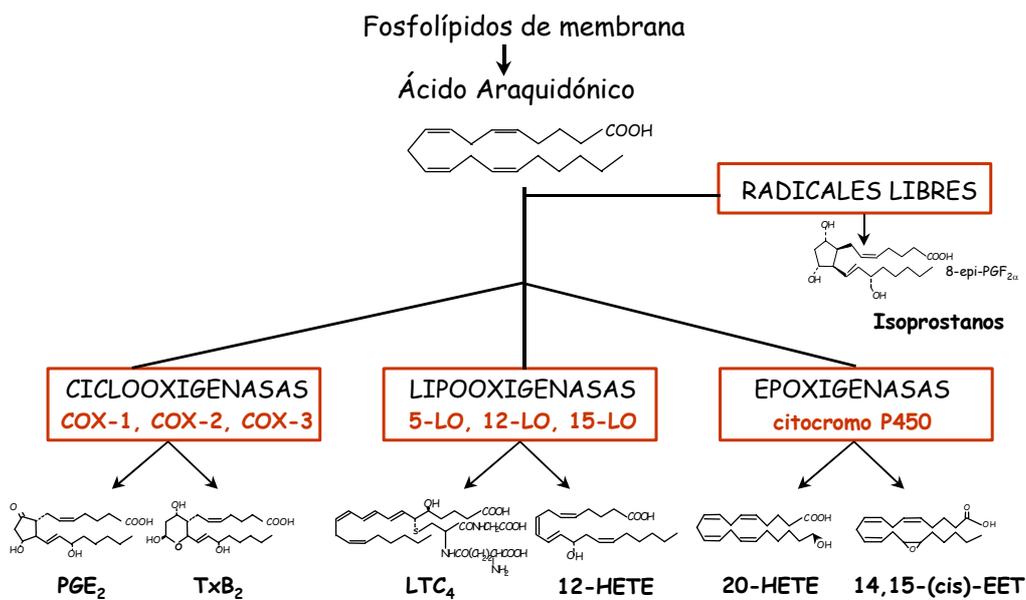


Figura 1. Metabolismo del AA.

2. Vía de las lipooxigenasas

Las LOs son una familia de enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura molecular del AA. La actividad LO fue descrita inicialmente en

plantas superiores como la soja (*Glycine max*) de la cual se han llegado a caracterizar hasta 8 LOs diferentes (5). En humanos existen tres LOs que oxidan el AA a la altura del carbono 5 (5-LO), 12 (12-LO) o 15 (15-LO) (*Figura 2*) formando los correspondientes hidroperóxidos lipídicos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE (1).

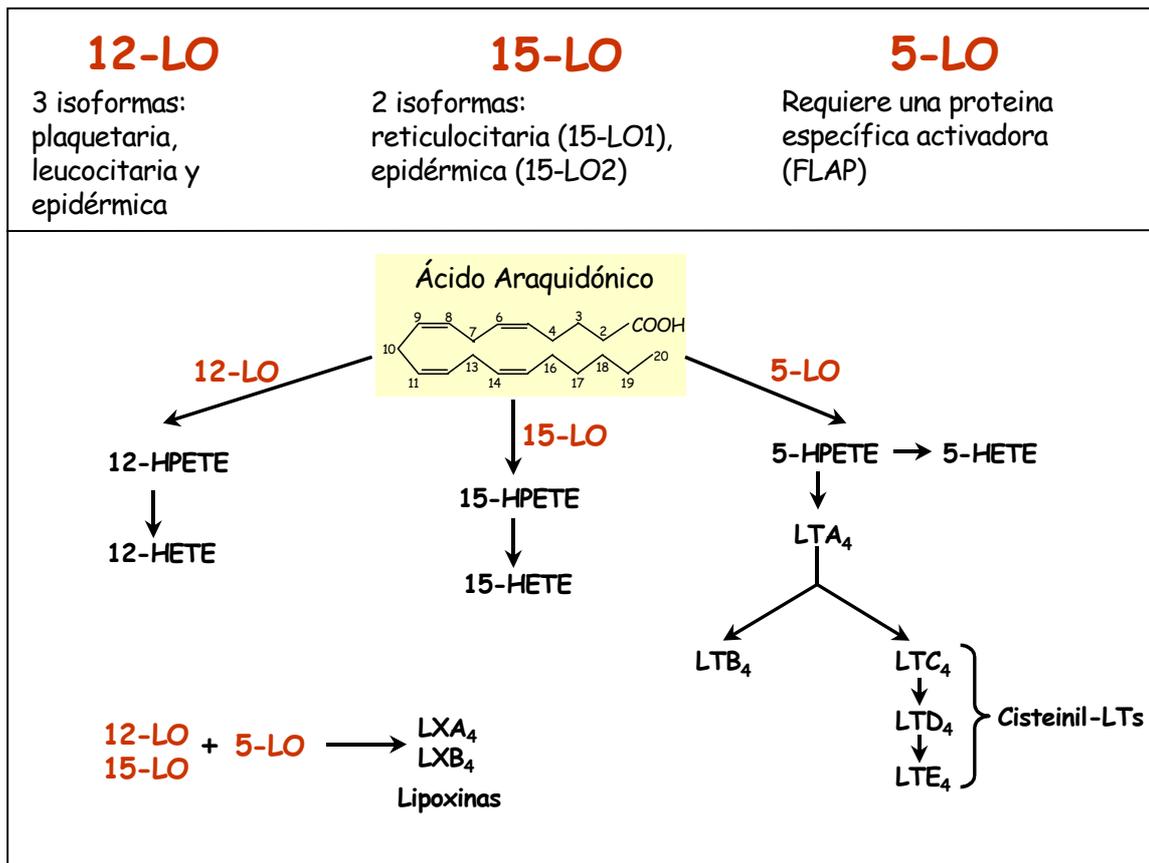


Figura 2. Biosíntesis de los derivados del AA producidos por la acción de la 5-, 12- y 15-LO.

Tal y como se esquematiza en la *Figura 3*, la LO cataliza en un primer lugar la eliminación esteroespecífica del hidrógeno *pro-S* de uno de los grupos metileno del AA, seguidamente se produce la isomerización de un doble enlace y la incorporación de una molécula de oxígeno formándose un radical peróxido que enseguida captura un protón para dar lugar a un grupo hidroperóxido. Esta reacción daría lugar a dos posibles esteroisómeros del HPETE, la forma *S* y la forma *R*, sin embargo las LOs en mamíferos típicamente producen

compuestos en configuración *S*. No ocurre así cuando el AA se oxida por rutas similares como es la ruta del citocromo P450 dando lugar a mezclas racémicas *S/R* (1). Los hidroperóxidos son altamente inestables y reactivos. Son transformados por una peroxidasa a los correspondientes ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE) que son los primeros compuestos derivados de las LOs con actividad biológica.

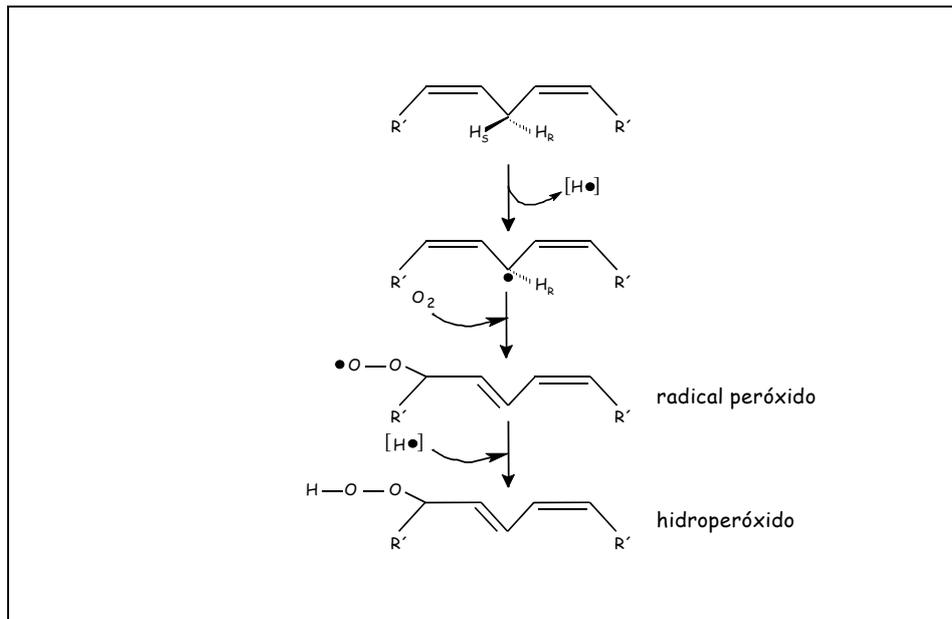


Figura 3. Formación del hidroperóxido (HPETE). La oxidación del AA, catalizada por la LO, implica la separación del hidrógeno de una unidad de 1,4-pentadieno, la adición de O_2 y la adición de nuevo del átomo de hidrógeno.

La nomenclatura tan sencilla de las LOs en mamíferos comporta algunas desventajas para el total entendimiento de esta vía debido a: (i) La especificidad posicional de la inserción del oxígeno no es absoluta pues depende de la estructura del sustrato, concentración y pH al cual se realiza la reacción. Así por ejemplo, la 15-LO además puede oxigenar el ácido linoléico a nivel del C-13 y oxigenar otros ácidos polienóicos esterificados en los fosfolípidos. Además, el AA puede ser oxigenado en más de una posición a la vez así, la 15-LO también puede oxigenar a nivel del C-12 produciendo tanto 15-HETE como 12-HETE en proporción 9:1 (6). (ii) En humanos existen tres isoformas de

la 12S-LO y una de reciente caracterización con actividad 12R-LO así como dos isoformas de la 15-LO que se diferencian entre ellas por sus propiedades enzimáticas y moleculares (7).

Mientras que las vías de la 12- y 15-LO sólo originan HETEs como compuestos biológicamente activos, la oxigenación del AA a través de la 5-LO da lugar a importantes mediadores como el 5-HETE, el LTB₄ y los cisteinil-LTs (*Figura 2*).

En mamíferos se producen también interacciones entre las diferentes LOs (por ejemplo entre la 12- o la 15-LO y la 5-LO) que dan lugar a un nuevo grupo de eicosanoides derivados del AA con importantes efectos biológicos: las lipoxinas (LX) (*Figura 2*) (8,9). La interacción entre la COX-2 acetilada por la aspirina con la 5-LO da lugar a epímeros de las LXs, las 15-epi-LXs (10). Las LXs y 15-epi-LXs muestran efectos opuestos a los LTs y por ejemplo, se comportan como antagonistas endógenos del efecto pro-inflamatorio del LTB₄ e inhiben el efecto vasoconstrictor renal del LTD₄ (8-11).

2.1. 12-Lipooxigenasa

Existen 3 isoformas de la 12-LO, denominadas según el tipo celular en el que fueron inicialmente caracterizadas: plaquetaria, leucocitaria y epidérmica (12). La forma leucocitaria de la 12-LO en mamíferos se encuentra ampliamente distribuida entre diferentes tipos celulares aunque la distribución tisular varía entre especies. Así, en la rata esta isoforma es más abundante en la glándula pineal seguida de pulmón, bazo, aorta, glándula adrenal, espina dorsal y páncreas. En ratón se encuentra mayoritariamente en macrófagos, glándula pineal, pituitaria y en menor grado en bazo, aorta e intestino. En conejo parece ser exclusiva de reticulocitos y se coexpresa con la 15-LO1. Es importante señalar que las isoformas leucocitarias de la 12-LO presentan una elevada homología con la 15-LO1 reticulocitaria por lo que también pueden generar cantidades importantes de 15-

HETE y por lo que también se denominan colectivamente 12/15 LOs (7). Las formas plaquetaria y epidérmica sólo se expresan en un número limitado de tipos celulares, así en humanos del mismo modo que en ratón, la forma plaquetaria se expresa tanto en plaquetas como en la epidermis. La forma epidérmica en ratón es característica de queratinocitos diferenciados de la epidermis así como de los folículos pilosos. En humanos esta actividad no ha podido demostrarse pero sí la existencia de un pseudogén en epidermis y folículos pilosos (12).

Los principales mediadores lipídicos de la actividad 12-LO, son sus productos finales, 12-HPETE muy inestable, y el 12-HETE para el cual se han caracterizado posibles receptores específicos en células de Langerhans humanas así como en una línea de carcinoma pulmonar (12). Aunque aún se desconoce el papel fisiológico de las 12-LO, existen algunos estudios que sugieren un importante papel en la liberación de neurotransmisores (13). A nivel fisiopatológico, la deficiencia de la 12-LO plaquetaria se asocia con diferentes enfermedades mieloproliferativas (14). También juega un papel significativo en la arterioesclerosis participando en la oxidación de las LDL (15,16) y en diferentes tipos de cáncer a nivel de la regulación del crecimiento celular y la apoptosis (17,18). Además, la actividad 12-LO se asocia a anomalías en el territorio vascular ya que tanto los niveles de 12-HETE como los de la 12-LO plaquetaria se encuentran elevados en pacientes con hipertensión esencial (19). Recientemente se ha caracterizado en queratinocitos humanos una nueva actividad 12-LO, la 12R-LO que se encuentra sobreexpresada en diferentes dermatosis proliferativas como la psoriasis. Hasta su descubrimiento, se creía que sólo la actividad citocromo P450 era la responsable de la síntesis de los productos quirales tales como el 12R-HETE puesto que en mamíferos aún no se había descrito ninguna actividad R-LO. El descubrimiento ha añadido una potente diana terapéutica más para el tratamiento de la psoriasis (20).

2.2. 15-Lipooxigenasa

En humanos se han caracterizado dos isoformas de la 15-LO cuya expresión se encuentra diferenciada entre tejidos. La 15-LO1 fue descrita originariamente en reticulocitos de conejo, pero también se expresa en otros tipos celulares sanguíneos como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos así como en células del epitelio pulmonar (21,22). Aunque el sustrato óptimo de la 15-LO1 es el ácido linoléico que oxida para dar lugar al ácido 13-hidroxióctadecadienoico (13-HODE), no se le ha asociado ninguna actividad biológica a este derivado. En cambio, el 15-HETE producido por la oxigenación del AA parece estar implicado en el proceso de maduración del reticulocito a eritrocito, así como en la reacción acrosómica en los espermatozoides y la liberación de prolactina por las células de la pituitaria. También se le atribuye un papel fisiopatológico al igual que la 12-LO en la oxidación de las LDL participado así, en la transformación del macrófago en célula espumosa (6). Recientemente, y en un estudio genético con ratones *knockout* para el gen de la 12/15LO, se ha demostrado que esta vía metabólica está implicada en el desarrollo del hueso siendo un regulador negativo del pico de densidad mineral ósea en el ratón (23). La expresión de la 15-LO2 de reciente caracterización parece estar restringida a pulmón, piel, próstata y córnea. Aunque esta nueva 15-LO parece ser específica de ciertos tejidos epiteliales, todavía se desconoce su localización celular si bien no se descarta la expresión de ambas isoformas tanto en piel como en córnea. Además parece diferenciarse de la 15-LO1 por tener mayor especificidad para el AA que para el ácido linoléico y oxidar casi exclusivamente a nivel del C-15 del AA (24).

2.3. 5-Lipooxigenasa

La 5-LO es la enzima más importante de la familia y se localiza sobre todo en células que participan en la respuesta inflamatoria como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y mastocitos. La 5-LO se encuentra en el citosol pero necesita translocarse a la membrana nuclear para interaccionar con su proteína activadora (FLAP) y poder oxigenar el AA para formar el 5-HPETE. Éste a su vez puede ser transformado por la 5-LO a un epóxido altamente inestable, el leucotrieno A₄ (LTA₄) que es el intermediario común de la síntesis de LTs. Alternativamente el 5-HPETE puede ser reducido por una glutatión-peroxidasa a 5-HETE, potente agente quimiotáctico y mitogénico (*Figura 4*) (25,26). Una vez sintetizado, el LTA₄, que es un compuesto inestable y altamente reactivo, puede ser transformado mediante la LTA₄ hidrolasa a LTB₄ o bien puede conjugarse con el glutatión mediante la actividad de la enzima LTC₄ sintasa para dar lugar al LTC₄. Por pérdida sucesiva de residuos aminoacídicos, el LTC₄ se transforma en LTD₄ y LTE₄, los cuales reciben el nombre genérico de péptido-LTs o cisteinil-LTs (*Figura 4*).

El LTB₄ es un potente agente inflamatorio que en neutrófilos estimula la quimiotaxis, la adhesión celular, la producción de ión superóxido y la liberación de enzimas hidrolíticos (8,27,28). Por el contrario, los cisteinil-LTs, que originalmente se identificaron como las sustancias de reacción lenta liberadas en el curso de las reacciones alérgicas e inmunes (*slow reacting substance of anaphylaxis o SRS-A*), son potentes vasoconstrictores que incrementan la permeabilidad vascular y la secreción de mucus (8,27,28).

Ya que la 5-LO constituye el eje troncal de esta tesis, sus características se detallan en los siguientes apartados de esta introducción.

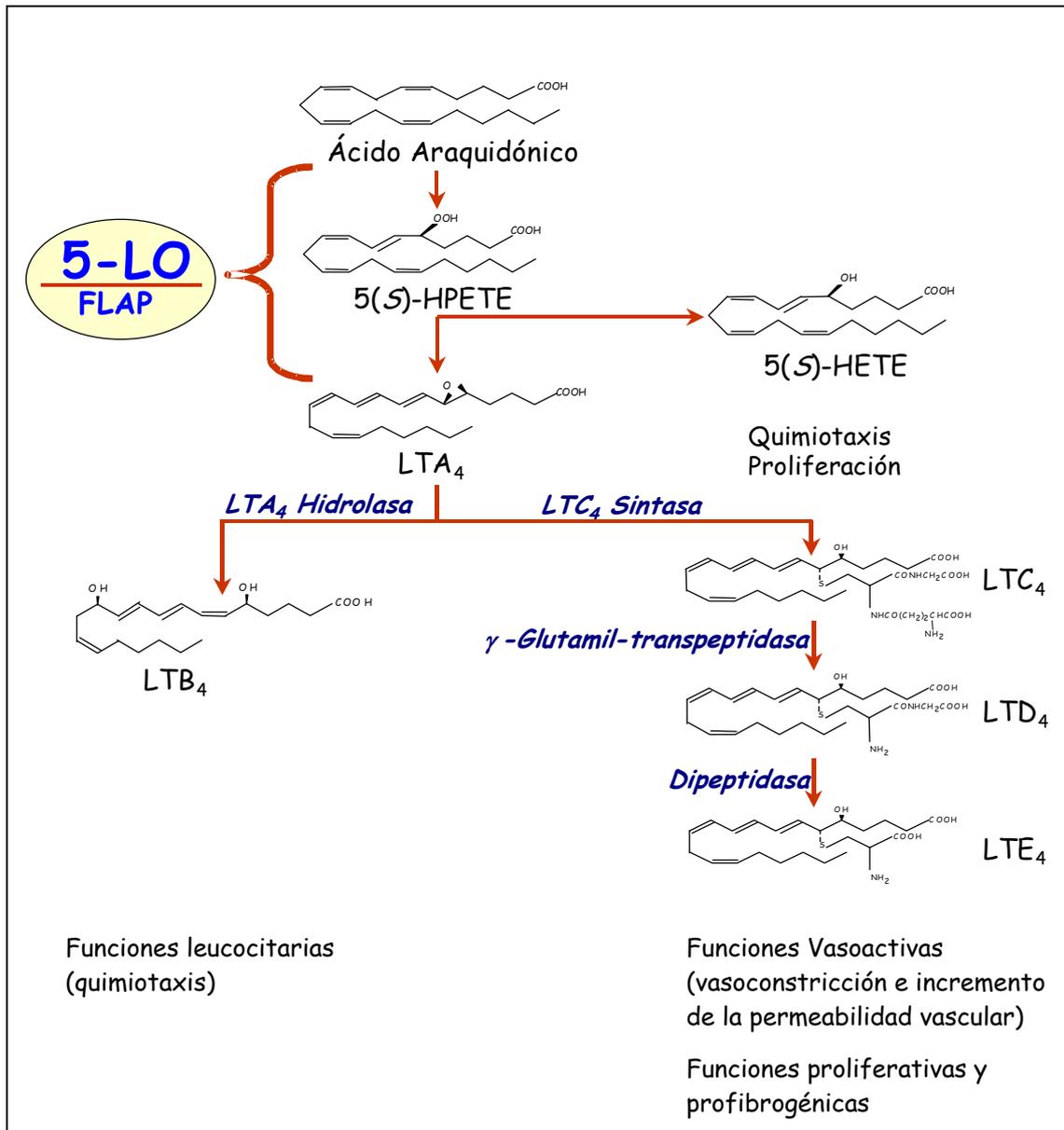


Figura 4. Biosíntesis y papel funcional de los mediadores lipídicos derivados de la actividad 5-LO: 5(S)-HETE y LTs.

II. Características moleculares de la 5-lipooxigenasa

1. El gen de la 5-LO y la regulación de su expresión proteica

El gen de la 5-LO en humanos se encuentra en el cromosoma 10q11.2, está formado por 14 exones divididos por 13 intrones y abarca una región de aproximadamente 82 kb.

Su promotor presenta características de los llamados genes *housekeeping* pues además de carecer de las típicas secuencias transcripcionales TATAA y CCAAT (29), es un promotor rico en repeticiones G+C y contiene bastantes secuencias consenso de unión a numerosos factores de transcripción como c-myb, AP-2, NF-kB, Sp1, Sp3 y los factores de crecimiento de respuesta temprana Erg-1 y Erg-2. También presenta los lugares de unión al receptor α del retinoico Z (RZR α) y al receptor del retinoico relacionado al receptor huérfano α (ROR α). Hasta la fecha no existen muchos estudios que describan las consecuencias funcionales de la unión de estos factores de transcripción al promotor de la 5-LO. De entre la bibliografía más relevante cabe destacar los trabajos sobre los factores Erg-1 y Sp1 pues podrían ser necesarios para la transcripción basal de la 5-LO (30,31). En este sentido, el análisis mutacional de la región en la que se localizan sus elementos de respuesta (entre las posiciones -212 y -88 pb con respecto al lugar de inicio de la transcripción) muestra la existencia de varias variantes polimórficas tanto en pacientes asmáticos como en sujetos sanos. Los ensayos de la actividad del promotor a través de genes reporteros muestran que la presencia de estas variantes alélicas produce tanto una disminución en la actividad del gen reportero como una alteración de la unión del factor de transcripción a su secuencia en el DNA (30,32). Y lo que es más interesante es la posible existencia de un efecto farmacogenético pues en pacientes asmáticos, la presencia en homocigosis de alguno de los alelos mutantes se asocia significativamente a una menor respuesta funcional pulmonar al tratamiento con inhibidores de la 5-LO (33). Hasta la fecha poco se conoce de los mecanismos implicados en la activación célula-específica del promotor de la 5-LO en respuesta a señales de diferenciación e inflamación. Los estudios realizados durante la maduración en las líneas celulares mieloides HL60 y MM6 demuestran que tanto el TGF β como el calcitriol son inductores muy fuertes de la 5-LO tanto a nivel de la expresión del RNA mensajero (mRNA), de la proteína y de la actividad

enzimática. Además, en la línea celular granulocítica HL60, el efecto del TGF β sobre la expresión proteica se ve incrementado por el TNF α y el factor de crecimiento de granulocitos GM-CSF. Éste último también se ha visto que induce la expresión de 5-LO en PMN humanos y que incrementa tanto la expresión de 5-LO y FLAP en monocitos humanos y en la línea celular THP-1 (para una revisión exhaustiva consultar Ref.(34)). Recientemente se ha descrito que la regulación de la expresión de la 5-LO puede realizarse a través de metilación/desmetilación de los lugares CpG situados en la región rica en G+C del promotor. Así, los inductores como la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ y el TGF β provocan la desmetilación de estas regiones y la inducción de expresión de la 5-LO tanto en células HL60TB como en células U937 (35).

Como se ha comentado anteriormente, la expresión proteica de la 5-LO está prácticamente restringida a células de origen mieloide tales como granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos y linfocitos B y coincide con la expresión de FLAP. No obstante existen excepciones a esta norma pues aunque las células T expresan FLAP son negativas para la expresión de 5-LO. Los eritrocitos, las plaquetas y las células endoteliales no expresan ni la 5-LO ni la FLAP. Sin embargo, tanto la expresión de 5-LO como de su proteína activadora también ha sido detectada en otros tipos celulares no mieloides como son los queratinocitos humanos diferenciados de la piel (36) y las células de Langerhans (37) así como en tejidos como el cerebelo y el hipocampo en la rata (38).

2. Reacciones catalizadas por la 5-LO

La 5-LO es una dioxigenasa que posee dos actividades enzimáticas que acaban por convertir a su substrato natural, el AA en LTA $_4$ (*Figura 4*): cataliza la incorporación de una molécula de oxígeno al AA (actividad oxigenasa) y la formación después del epóxido inestable LTA $_4$ (actividad LTA $_4$ sintasa) (39,40). La 5-LO primero cataliza la abstracción

del hidrógeno pro-S en posición C-7 del ácido graso seguida de la inserción del oxígeno molecular en la posición C-5 dando lugar al correspondiente hidroperóxido, el 5(S)-hidroperoxi-6-*trans*-8, 11, 14-cis-ácido eicosatetraenoico (5-HPETE) compuesto inestable y altamente reactivo. En la subsecuente conversión del 5-HPETE a LTA₄ interviene la abstracción del hidrógeno pro-R del C-10 y el desplazamiento alílico del radical al C-6 para dar lugar al ácido 5, 6 epoxi-eicosatetraenoico o también LTA₄. De forma alternativa el 5-HPETE puede ser reducido por una glutatión-peroxidasa a 5-HETE que como ya se ha comentado anteriormente en el capítulo I (2.3), es el primer derivado de esta vía biosintética con actividad biológica bien reconocida. *In vitro*, la formación relativa de LTA₄ versus 5-HETE a partir de 5-HPETE depende de varios factores entre los que destacan las concentraciones relativas de AA y 5-HPETE libres, la asociación a membrana, la cantidad de 5-LO y la presencia de FLAP (34,41-43).

Como otras LOs, la actividad hidroxidasa de la 5-LO depende de un agente reductor. Se sabe que la 5-LO posee en el lugar de catálisis una molécula de hierro que actúa como aceptor o donador de electrones durante la catálisis y en la primera reacción, la forma ferrosa de la 5-LO (Fe²⁺) reacciona con el hidroperóxido lipídico para formar la forma férrica activa de la 5-LO (Fe³⁺). Se reestablece la forma ferrosa de la 5-LO al utilizar un agente reductor como puede ser *N*-hidroxiureas e hidroxibezofuranos. Los compuestos que sirven como agentes reductores de esta actividad hidroxidasa inhiben la actividad oxigenasa de la 5-LO.

3. Factores estimuladores de la actividad enzimática de la 5-LO

3.1. Calcio (Ca²⁺)

En los primeros estudios realizados en células intactas se demostró que la incubación con ionóforos de Ca²⁺ producía un aumento en la biosíntesis de eicosanoides

derivados de la 5-LO (44,45) lo que ya sugería un papel importante del Ca^{2+} en la activación de esta enzima. Los ensayos *in vitro* de la actividad de la 5-LO purificada indican que las concentraciones de Ca^{2+} necesarias para que se produzca la mitad de la activación máxima de la enzima (EC_{50}) oscilan entre 1 y 2 μM mientras que la activación máxima se produce entre 4 y 10 μM (46-48). Sin embargo, para conseguir la activación de la 5-LO en células intactas, se requieren concentraciones intracelulares mucho más bajas (200 nM) (49). El Ca^{2+} incrementa la hidrofobicidad de la 5-LO y provoca la unión de la enzima a vesículas de fosfatidilcolina (46,50) además, estimula la translocación de la 5-LO hacia el núcleo y promueve su asociación a la membrana nuclear (46,51-53). Recientemente se ha caracterizado un posible dominio de unión al Ca^{2+} en la región N-terminal de la 5-LO (54) necesario para la activación de la enzima. Actualmente existe el convencimiento generalizado de que el incremento del Ca^{2+} intracelular en respuesta a un estímulo es un parámetro esencial para la biosíntesis de LTs. Sin embargo, existen algunos estudios que indican que la necesidad de Ca^{2+} para la activación de la 5-LO depende del tipo celular estudiado o bien de los niveles intracelulares de AA libre. Así, tanto en mastocitos como en neutrófilos estimulados únicamente con AA se ha observado que la activación de la 5-LO no implica necesariamente un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular (55-57). Además, se sabe que de entre otros cationes divalentes (bario, estroncio, manganeso), el magnesio (Mg^{2+}) puede sustituir al Ca^{2+} y producir también la estimulación de la actividad 5-LO aunque de forma no tan eficiente (58). En este sentido y dado que en la célula las concentraciones de Mg^{2+} libre son elevadas (de hasta 1 mM), estos estudios sugieren un papel importante para este catión en la actividad basal de la 5-LO en aquellas células no sujetas a ningún estímulo en particular.

3.2. ATP

La actividad catalítica de la 5-LO puede ser estimulada por el ATP y en menor grado por otros nucleótidos entre los que se incluyen el ADP, AMP, cAMP, CTP y UTP (59-61). La estimulación por ATP requiere la presencia de Ca^{2+} (48,61,62) pero también es efectiva en presencia de Mg^{2+} (58,63). La hidrólisis de ATP así como el consumo de energía o la autofosforilación no parecen ser necesarios para la estimulación de la actividad de la 5-LO (60). La concentración intracelular de ATP *in vivo* se encuentra en el rango milimolar por lo que el MgATP^{2-} (la forma mayoritaria de ATP intracelular) parece ser el estímulo fisiológico (58).

3.3. Fosfolípidos

Durante la purificación inicial de la 5-LO a partir de leucocitos humanos se observó que su actividad enzimática se veía incrementada en presencia de fracciones de membrana celular (39,63). Además este efecto estimulador podía ser mimetizado en presencia de vesículas lipídicas formadas por fosfatidilcolina (PC) y no por otros fosfolípidos como la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol o el diacilglicerol (48). Se ha observado que la catálisis tiene lugar en la interfase entre el lípido y el agua que es donde se cree que la 5-LO es activa (64), y que los efectos estimuladores de la PC tienen lugar tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} (58,63).

3.4. Hidroperóxidos lipídicos

Para que se produzca la catálisis de la 5-LO, el ión ferroso de la forma inactiva de la enzima ha de ser oxidado a la forma férrica por un hidroperóxido. De entre varios hidroperóxidos, el 5-HPETE, el 12-HPETE y el 13-HPODE son los que principalmente pueden estimular la actividad de la 5-LO (65).

3.5. Proteínas celulares

La 5-LO purificada de varias fuentes celulares es una enzima altamente inestable, pierde la mitad de su actividad durante 24 h de almacenamiento a 2°C (66). Esta inactivación enzimática parece ser debida a la acción destructora que ejercen los radicales libres derivados del oxígeno sobre el lugar activo correspondiente al hierro. De hecho, las actividades glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en presencia de grupos tiol consiguen estabilizar la 5-LO purificada (67). *In vitro*, la presencia únicamente de 5-LO purificada, AA, Ca²⁺ y ATP no es suficiente para producir una activación enzimática consistente. Durante los estudios de purificación de la 5-LO realizados por Rouzer et al. se aislaron a partir de leucocitos tres factores estimuladores no dializables, un componente de membrana y dos componentes citosólicos (39,68). Hasta la fecha no se conoce la identidad de estos componentes, se sabe que el factor asociado a membrana y estable al calor puede ser sustituido por vesículas sintéticas de PC (48) y que los factores citosólicos son capaces de estimular la actividad de la 5-LO al estabilizar la proteína durante la preincubación (69).

4. Proteína activadora de la 5-LO (FLAP)

La FLAP es una proteína asociada a membrana de 18 kDa y fue descubierta como diana del inhibidor de la biosíntesis de LTs MK886 (70). Se observó que este compuesto era capaz de inhibir la biosíntesis de LTs en leucocitos intactos pero incapaz de suprimir la actividad catalítica de la 5-LO en fracciones celulares. Tanto el cDNA de la rata como el humano codifican para una proteína de 161 aminoácidos con tres regiones transmembrana y dos *loops* hidrofílicos (71). Es importante destacar que la FLAP y la LTC₄ sintasa son proteínas muy similares, presentan una identidad del 31% a nivel de su estructura aminoacídica y alta homología a nivel de los dominios de unión (72).

La FLAP se coexpresa junto a la 5-LO en células de origen mieloide como granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos B y en general una sobreexpresión de FLAP se correlaciona con la sobreexpresión de 5-LO (73,74). Se ha observado que un aumento en la biosíntesis de LTs se correlaciona con una sobreexpresión de ambas proteínas tanto en PMN tratados con GM-CSF (75) como en monocitos expuestos a la dexametasona (76), al GM-CSF o a la IL-3 (77). También los eosinófilos procedentes de ratas sensibilizadas con ovoalbúmina se encuentra sobreexpresión de las dos proteínas (78). Por otro lado, y como se ha comentado en el capítulo I (2.3) existen tipos celulares negativos para la 5-LO que expresan la FLAP, entre éstos se encuentran células T linfoblastoides, células no diferenciadas MM6 (79) e histiocitos U937 diferenciados por DMSO (80). Además, en algunos casos el patrón de expresión de FLAP es claramente diferenciado del de la 5-LO así, en eosinófilos humanos tanto la IL-5 como la dexametasona incrementan la expresión de FLAP sin alterar la expresión de la 5-LO (78). También se ha observado que durante el proceso de maduración de los macrófagos alveolares existe una inducción de la expresión de la FLAP lo que sugiere que en este tipo celular, esta proteína puede actuar como factor limitante de la capacidad de producir un incremento en la síntesis de LTs a partir de fuentes endógenas (81). Existen diferentes evidencias experimentales que indican que la presencia de la FLAP es absolutamente necesaria para la biosíntesis celular de LTs a partir de fuentes endógenas de AA. En concreto, los experimentos de transfección realizados en una línea celular de osteosarcoma humano muestran que la síntesis de LTs por inducción con ionóforo A23187 sólo se produce cuando las células se cootransfectan con la 5-LO y la FLAP además, el inhibidor MK886 es capaz de bloquear esta síntesis. Sin embargo, la células transfectadas únicamente con la 5-LO no son capaces de producir LTs (71). Además, los macrófagos procedentes de ratones deficientes en la FLAP tampoco producen niveles detectables de

LTs (82). Sin embargo no parece existir un requerimiento absoluto de la FLAP cuando las células se estimulan con AA exógeno (41) de hecho, en estas condiciones experimentales el MK886 no es capaz de inhibir la síntesis de LTs (81,83,84). No obstante, la FLAP podría estar estimulando la utilización de este AA exógeno promoviendo la conversión del 5-HPETE a LTA₄ (41), de hecho se ha encontrado que la FLAP puede unirse al AA y a otros ácidos grasos insaturados en *cis* y que éstos compiten por la unión a la FLAP con inhibidores de la actividad 5-LO como el Bay-X-1005 y el MK886 (85,86). Todo ello sugiere que la FLAP podría actuar como proteína transferidora de AA facilitando así, la presentación del sustrato a la 5-LO y posibilitar la síntesis óptima de LTA₄ (41,87). Aunque no existe una evidencia directa de la asociación de ambas proteínas, se ha propuesto un modelo en el que la FLAP unida al AA forma un heterodímero con la 5-LO siendo esta asociación favorecida por un incremento en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (74).

5. Localización subcelular de la 5-LO

Durante muchos años se asumió que la biosíntesis de LTs tenía lugar a nivel de la membrana plasmática, no sólo por el hecho de que los LTs son secretados extracelularmente sino también porque al realizar el fraccionamiento celular de leucocitos en reposo en fracciones solubles y particuladas se determinó que tanto la PLA₂ como la 5-LO eran proteínas solubles mientras que la FLAP se encontraba asociada a membrana (70) y que además, al estimular las células ambas proteínas solubles se translocaban de manera Ca²⁺ dependiente a la fracción de membrana (52,88). En estudios posteriores se han utilizado técnicas más sofisticadas de fraccionamiento celular y técnicas de microscopía que han dado a conocer que la translocación de la 5-LO en la célula es un proceso más complejo que la simple asociación a membrana (89,90). Se ha encontrado que la FLAP es

una proteína principalmente asociada a la membrana nuclear ya sea tanto en células en reposo como en células activadas (91,92) y que además la 5-LO y la PLA₂ se translocan a este lugar después de la activación celular (91,93). Por lo tanto la síntesis de LTs tiene lugar a nivel de la membrana nuclear donde la 5-LO soluble una vez a translocado, puede metabolizar al AA. Sin embargo, el proceso de movilización de la 5-LO es más complicado aún ya que recientemente se han encontrado niveles importantes de 5-LO en el compartimento soluble del núcleo, localización subcelular que además depende del tipo celular estudiado. Así, la 5-LO se encuentra principalmente en el citoplasma celular de neutrófilos y monocitos circulantes (94). Ocurre del mismo modo en células HL60 diferenciadas (95), células MM6 (96) y macrófagos peritoneales (91). En macrófagos alveolares en reposo (94), células de leucemia basofílica de rata (97), mastocitos murinos derivados de médula ósea (98) y células de Langerhans humanas (37), la 5-LO se encuentra parcialmente o predominantemente en el compartimento soluble del núcleo. Esta localización celular también ha sido caracterizada en varias líneas celulares transfectadas con la 5-LO incluyendo macrófagos RAW, mastocitos derivados de médula ósea, y en varias líneas celulares no mieloides como células HEK 293, COS, CHO y NIH-3T3 (99,100). Aún así, tanto el *pool* intranuclear de 5-LO como el citosólico se encuentran asociados a la membrana nuclear después de la estimulación celular (91,93,94). Hasta la fecha, se desconoce si 5-LO citosólica se une a la membrana nuclear desde la cara citoplasmática o si primero entra al núcleo para asociarse después a la membrana desde la cara nuclear (*Figura 5*).

La translocación al compartimento soluble del núcleo depende de las secuencias de localización nuclear (NLS) y no tiene porqué estar asociada a la síntesis de LTs. Estas secuencias se encuentran en proteínas mayores de 50 kDa que han de ser importadas al núcleo. Las NLS mejor caracterizadas están formadas por un grupo de aminoácidos

básicos (arginina o lisina) que es reconocido específicamente por un receptor citoplasmático denominado importina α . Una vez se asocia este receptor a la proteína a ser translocada, se une una nueva subunidad proteica, la importina β que será la que facilite la asociación del complejo proteico al poro nuclear y la consecuente entrada al núcleo. Estudios preliminares determinaron posibles NLS tanto en el extremo N-terminal como en el extremo carboxi de la 5-LO (99-102), pero no ha sido hasta la fecha que se han identificado con claridad tres regiones básicas a nivel de la Arg⁵¹⁸, Arg¹¹² y Lys¹⁵⁸ responsables del transporte de la 5-LO al núcleo (103,104).

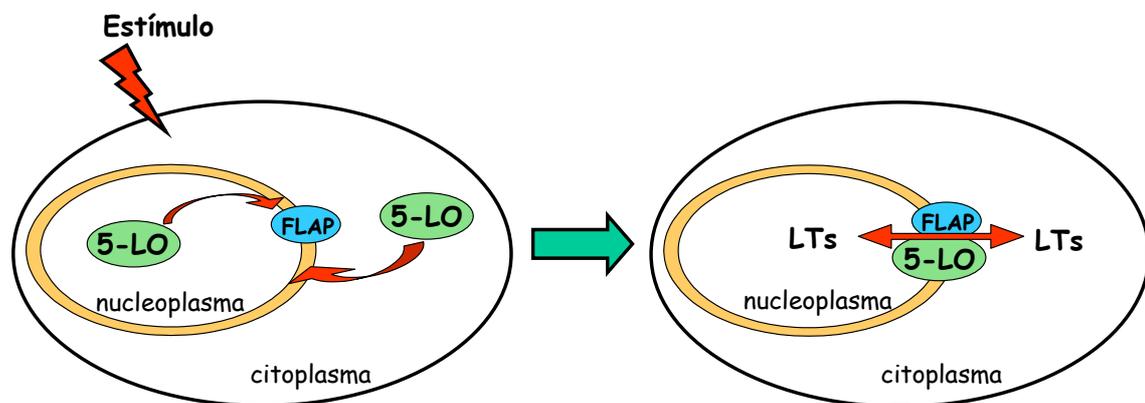


Figura 5. Localización subcelular de la 5-LO. Existen dos *pools* de 5-LO soluble en la célula: un *pool* intranuclear y un *pool* citosólico. Dependiendo del tipo celular estudiado un *pool* puede ser más abundante que otro. Después de un estímulo celular la 5-LO soluble transloca a la membrana nuclear donde es capaz de metabolizar el AA a LTs.

El movimiento de la 5-LO citosólica al núcleo es un proceso regulado ya que puede verse incrementado por adhesión celular, reclutamiento o citoquinas y, como se ha comentado anteriormente puede o no estar asociado a síntesis de LTs. Por ejemplo, la 5-LO citosólica se mueve al núcleo en neutrófilos peritoneales de rata después del tratamiento *in vivo* con agentes inflamatorios y también *in vitro* después de activar los neutrófilos por adhesión al vidrio además, la translocación viene acompañada por una

mayor capacidad para sintetizar LTs en respuesta al ionóforo (105). De manera similar la migración de los monocitos al espacio alveolar y no al peritoneo provoca la redistribución reversible de la 5-LO al núcleo lo cual también se acompaña por una mayor capacidad de síntesis de LTs (106). Cabe destacar que las concentraciones necesarias de ionóforo para producir niveles de LTs similares a los producidos por la 5-LO citosólica son mucho mayores tanto para los macrófagos alveolares como para los PMNs reclutados (105,107). Los estudios de mutagénesis dirigida realizados recientemente en células NIH-3T3 demuestran que la mutación de las tres NLS presentes en la 5-LO no sólo bloquean la translocación al núcleo de esta proteína sino que además reducen en un 90% la síntesis de LTB₄ (108). Contrariamente a lo que ocurre con los PMNs, los eosinófilos activados por adhesión tienen menor capacidad de síntesis de LTs lo que coincide con la imposibilidad que tienen éstos de translocar la 5-LO intranuclear a la membrana bajo este estímulo (109). Sin embargo, los eosinófilos bajo otros estímulos como la interleuquina IL-5 sintetizan LTs lo que coincide con la localización nuclear de la 5-LO (78). Los eosinófilos realmente constituyen un paradigma de la síntesis de LTs ya que además de lo ya comentado anteriormente, cuando se estimulan con PAF, la 5-LO pasa rápidamente a asociarse a los cuerpos lipídicos y esto se correlaciona con una mayor producción tanto de productos derivados de la 5-LO como de la COX (110).

A diferencia de la translocación nuclear, la asociación de la 5-LO a la membrana nuclear tiene lugar de forma Ca²⁺ dependiente y siempre se asocia con la generación de LTs. Después de la estimulación celular con distintos agonistas que causan flujos de Ca²⁺ intracelular, la 5-LO se une a la membrana nuclear. En macrófagos peritoneales estimulados con ionóforo, la utilización de compuestos quelantes como el EDTA provoca la disociación reversible de la 5-LO de la membrana (111). Además de los ionóforos existen otros estímulos fisiológicos que inducen la asociación a membrana de la 5-LO

como el fMLP, el zimósán o el antígeno IgE (56; 111-113). También se ha encontrado en PMN depleccionados en adenosina que el AA administrado de forma exógena induce la translocación de la 5-LO a la membrana vía un mecanismo de estimulación autocrino mediado por el LTB₄ (56).

La región de unión al Ca²⁺ de la 5-LO (residuos 1 a 114) también está implicada en la asociación a membrana inducida por ionóforo (114). La PLA₂ y la PKC también presentan dominios C2 de unión a membrana (115,116). Sin embargo, las secuencias NSL también podrían ser necesarias para la redistribución de la 5-LO inducida por agonistas ya que se ha observado que el péptido sintético formado por una señal hidrofóbica fusionada con las secuencias consenso NSL (residuos 566-577) inhibe la translocación de la 5-LO inducida por ionóforo en células HL60 (102). Posiblemente existan otras proteínas que al interactuar con la 5-LO estén influenciando su distribución subcelular y el transporte al interior nuclear. Finalmente, otro factor que podría influenciar en su translocación es la fosforilación de la 5-LO descrita recientemente (96,117-120).

La importancia de la translocación de la 5-LO para la síntesis de LTs se ha confirmado utilizando diferentes tipos celulares fagocíticos (96). En la línea celular monocítica MM6, se encuentran niveles abundantes de 5-LO en el citosol mientras que la FLAP se encuentra localizada en la membrana nuclear. Después del tratamiento con ionóforo se liberan niveles sustanciales de AA endógeno pero la síntesis de LTs es muy baja y no se detecta translocación de la 5-LO citosólica a la membrana nuclear. La coadición al cultivo celular de AA exógeno genera una importante cantidad de LTs pero sólo se observa un incremento marginal de 5-LO unido a membrana. Esto parece indicar que cuando existe una abundante disponibilidad de substrato la síntesis de LTs puede tener lugar en el citosol. Por el contrario, en ausencia de AA exógeno, la 5-LO no transloca a la membrana nuclear donde puede acceder al AA endógeno liberado por la PLA₂. Sin embargo, al tratar primero las

células con PMA la inducción con ionóforo provoca un incremento de la translocación de la 5-LO al núcleo y la formación de LTs a partir del AA endógeno. Se han obtenido resultados similares en PMNL estimulados con concentraciones subóptimas de ionóforo (0.1 μ M) (96). El pretratamiento con LPS incrementa la translocación de la 5-LO inducida por el fMLP y la síntesis de LTs sin embargo, a pesar de haber estimulado las células con LPS, los niveles de AA endógeno liberado son bajos (121).

6. Interacción con otras proteínas

6.1. Factor de crecimiento ligado al receptor de la proteína 2 (Grb2), actina y α -actinina

La 5-LO contiene un dominio rico en prolina (residuos 566-577) identificado como el motivo de unión Src de homología 3 (SH3). Esta secuencia le permite interactuar con el dominio SH3 del factor de crecimiento ligado al receptor de la proteína 2 (Grb2), una proteína adaptadora de la cascada de señalización mediada por tirosín-quinasa (122). En ensayos de competición por la unión a ligando, el péptido sintético que contiene el dominio SH3 de la 5-LO inhibe la unión de ésta al Grb2 e interfiere también en la translocación de la 5-LO del citosol a la membrana en neutrófilos humanos (122,123). También se ha hipotetizado que la señalización via tirosín-quinasa sería un proceso distinto del de la biosíntesis de mediadores lipídicos.

En condiciones fisiológicas, la actina globular monomérica (actina G) se encuentra en equilibrio con la forma polimerizada de la actina (actina F) que es la que forma el citoesqueleto celular de actina, responsable tanto de la forma como de la motilidad celular así como de los procesos de fagocitosis y citocinesis. La 5-LO *in vitro* se asocia a la actina en columnas de sefrosa y esta asociación puede ser reducida por un péptido que contiene el dominio de unión SH3. La 5-LO también se une *in vitro* a la α -actinina, proteína

ligadora que se encuentra entre los filamentos de actina y débilmente unida a la miosina (122). La asociación entre la 5-LO y la actina *in vitro* y la movilidad de la 5-LO en las células indica la asociación de esta proteína con estructuras del citoesqueleto. También se ha observado que ácidos monohidroxílicos incluyendo el 5-HETE pueden unirse a la actina citosólica (124). Es interesante destacar que la inhibición de la polimerización de la actina por la citocalasina B incrementa la síntesis de LTs inducida por fMLP en PMN (125,126) mientras que en macrófagos alveolares tratados con colchicina (rompe los microtúbulos) inhibe la síntesis de derivados de la 5-LO a partir del AA endógeno (127).

6.2. Proteína semejante a la coactosina (CLP)

Las actividades del citoesqueleto de actina son reguladas por numerosas proteínas de unión a actina (128). La CLP (142 aminoácidos, 16 kDa) es similar a la coactosina encontrada en *Dictyostelium discoideum* (129) un miembro del grupo de proteínas ligadas a actina denominado ADF/Cofilina (130). La coactosina interacciona con los filamentos de actina promoviendo su polimerización (131). En el sistema de dos híbridos en levaduras se observó que la 5-LO interacciona con la CLP (132), posteriormente se confirmó la unión entre ambas proteínas en células HEK 293. La asociación sigue una estequiometría de 1:1 y es independiente de Ca^{2+} siendo la lisina 131 de la CLP esencial para la unión de la 5-LO (133). La CLP se expresa en células mieloides y en células transfectadas con CLP ésta se colocaliza con las fibras de estrés de la actina. La unión de la CLP a la actina sigue una estequiometría de 1 CLP por cada 2 subunidades de actina siendo la lisina 75 crucial en su unión a la actina (133). No se ha observado la formación de complejos formados por actina F, CLP y 5-LO pero sí que la 5-LO compite con la CLP por su unión con la actina F. También se ha encontrado que la 5-LO interfiere en la polimerización de la actina lo que ha sugerido un papel de la 5-LO en la dinámica de la actina (133). Curiosamente, un

reciente trabajo ha descrito que la translocación a la membrana plasmática de la 12/15 LO incrementa la polimerización de la actina (134).

6.3. Proteína 1 asociada al receptor I del TGF β (TRAP-1)

Las proteínas Smad transducen las señales producidas por la superfamilia de ligandos del TGF β regulando procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular a través de la activación de receptores serín/treonín quinasa. La proteína TRAP-1 (860 aminoácidos) se une sólo a la forma activada del receptor I del TGF β (135), se trata una chaperona de Smad4 que podría actuar facilitando la transferencia de Smad4 a otras proteínas Smad después de la activación de éstas por el receptor del TGF β (136). Mediante el sistema de doble híbrido en levaduras se ha determinado que la 5-LO interacciona con la mitad del extremo carboxi terminal de TRAP-1 (132), región de unión al receptor I del TGF β . Previamente se encontró que el tratamiento con TGF β (junto con la vitamina D3) de células HL60 o células MM6 produce un incremento en la expresión y actividad de la 5-LO (137). Se ha especulado que estas asociaciones pueden ser la base de un mecanismo de *feed-back* en lo que refiere a los efectos del TGF β sobre la 5-LO.

6.4. RNasa III/RNA helicasa, el Dicer humano

El sistema de *screening* del doble híbrido utilizando la 5-LO como señuelo también ha podido identificar clones que contienen la zona C-terminal del cDNA de una nueva proteína humana de elevada homología con la hipotética helicasa K12H4.8 de *C. elegans* (132). La secuencia aminoacídica predecida contiene motivos de la RNasa III y un dominio de unión a RNA de doble cadena. El cDNA completo (138) contiene motivos helicasa en la zona N-terminal. Recientemente se caracterizó que la proteína análoga en *Drosophila*

(Dicer) está implicada en el mecanismo de acción del RNA de interferencia (RNAi) (139). El RNAi, es un RNA de doble cadena que silencia genes afines lo que constituye un mecanismo post-transcripcional de silenciación de la expresión génica (140). El papel específico de Dicer es digerir largos RNA de doble cadena (200-500 nucleótidos) para formar los RNAi, secuencias guía de 22 nucleótidos que sirven para informar a la nucleasa multicomponente (complejo RISC) para la destrucción de los mRNA mensajeros que contengan la misma secuencia. La posible interacción de la 5-LO y el RNAi es de un interés considerable pero en la actualidad no existe ningún estudio que certifique esta asociación.

6.5. Otras proteínas

En inmunoprecipitados de NF-kB procedentes de lisados celulares de células HL60 se ha detectado que existen niveles elevados de 5-LO. Estos niveles se incrementan cuando se han estimulado las células con ionóforo pero son bajos cuando se bloquea la translocación de la 5-LO. De este estudio se concluyó que la 5-LO podría jugar algún papel en la respuestas mediadas por NF-kB (102).

7. Regulación de la actividad de la 5-LO

7.1. Incremento del Ca^{2+} intracelular

Uno de los factores más importantes para la activación de la 5-LO es el incremento de Ca^{2+} intracelular. Los estímulos más utilizados *in vitro* tales como ionóforos, tapsigargina, PAF, LTB_4 , fMLP, C5a, citoquinas, partículas fagocitarias como el zimósán y urato o cristales de fosfato producen un aumento más o menos significativo de Ca^{2+} lo que se correlaciona con la síntesis de LTs (ver bibliografía del capítulo II, punto 3).

La generación de productos derivados de la 5-LO depende de la disponibilidad de AA libre lo que está íntimamente relacionado con la actividad de la cPLA₂. De entre los muchos isotipos de PLA solubles, la cPLA₂ de 85 kDa es la más importante a la hora de proporcionar el AA para síntesis de LTs y otros eicosanoides (141) de hecho, los estudios realizados con ratones *knockout* de esta enzima así lo confirman (142,143). Se ha encontrado que el Ca²⁺ y/o la fosforilación de la cPLA₂ a nivel de la Ser-505 por la MAPK puede activar a la fosfolipasa induciendo su translocación a la membrana nuclear y la producción de AA (142,144-146). Así y aunque existen excepciones, la activación de esta enzima puede ocurrir en presencia de niveles basales de Ca²⁺ si existen estímulos que fosforilan la Ser-505 o bien en presencia de agentes movilizadores de Ca²⁺ cuando se bloquea la fosforilación de la cPLA₂, (145). Sin embargo, la fosforilación parece ser indispensable cuando la movilización de Ca²⁺ es transitoria (ej. zimosán) (147). Se sabe que la estimulación de la vía de la 5-LO en leucocitos causada por sus ligandos naturales produce una pobre síntesis de LTs y que esto está relacionado con una escasa disponibilidad de AA. Sin embargo, la administración simultánea de AA exógeno y PAF, C5a o fMLP incrementan de manera considerable la formación de LTs en PMN (49,148-153). Los llamados “agentes cebadores” como factores de crecimiento, citoquinas, ésteres de forbol, lipopolisacáridos y el virus de Epstein Barr no son capaces de estimular la síntesis de LTs por sí solos pero incrementan la generación de LTs de forma muy potente después de estimular las células con su ligando natural. Debido a la compleja regulación de la 5-LO y a la existencia de varias actividades enzimáticas dentro de esta vía biosintética hace que por el momento se desconozca a qué niveles de esta ruta biosintética se produce este efecto “cebador” (75,78,81).

7.2. Fosforilación de la 5-LO

La fosforilación proteica es un mecanismo regulador de la transducción de señales intracelulares e incluye la activación y redistribución de numerosas enzimas celulares y factores de transcripción. En la secuencia primaria de la 5-LO se han encontrado dominios de fosforilación para la PKA, PKC, la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), la proteína quinasa activada por la quinasa mitógena activada (MAPKAPK, MK)-2 y 3, la quinasa S6, la MAPK1/2 y la Cdc2. Sin embargo, para que tenga lugar la fosforilación no es suficiente con la presencia de estos dominios sino que depende además de las características estructurales de la proteína sustrato.

Para que enzimas como la cPLA₂ y la PKC se activen, se requiere tanto de procesos de fosforilación como de la presencia de Ca^{2+} . Para la activación de la 5-LO se asume que sólo es necesario un incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y la asociación a la membrana nuclear. Por ello, en un principio se creyó que la fosforilación de la 5-LO era un suceso improbable o redundante para la activación enzimática (52). Hoy en día, la fosforilación de la 5-LO se considera un mecanismo alternativo de activación de la 5-LO que se puede producir en presencia de niveles elevados o moderados de Ca^{2+} intracelular. En 1996, Lepley y colaboradores demostraron la existencia de pequeñas cantidades de 5-LO fosforilada asociada al DNA genómico en células HL60 diferenciadas con DMSO (117). Este *pool* de 5-LO fosforilada sólo se encontraba en el núcleo de células estimuladas con ionóforo y no en células en estado de reposo. Además, los inhibidores de las tirosin quinasa suprimían tanto la translocación de la 5-LO como la síntesis de LTs en células granulocíticas estimuladas con ionóforo (117). Los estudios basados en la utilización de inhibidores específicos de la MAPK quinasa 1 y 2 como el PD98059 y el U0126 han sugerido que la vía de las MAPK está implicada en la activación de la 5-LO (112,118). Sin embargo la MAPK es incapaz de fosforilar la 5-LO *in vitro* (117). Recientemente se ha

sugerido también un papel de la vía JAK/STAT pero esto está todavía por confirmar (154). Mediante la utilización de ensayos quinasa en gel, que permiten la detección de actividades quinasa para un sustrato concreto, se ha encontrado que la MAPK p38 regulada por MK2 y MK3 (MK2) puede fosforilar directamente la 5-LO *in vitro* en leucocitos estimulados (120). Las MKs fosforilan sus sustratos a nivel de la serina situada en la secuencia hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-Ser (donde hyd es un residuo hidrofóbico). Esta secuencia se encuentra en la 5-LO (266:LERQLS) siendo la Ser-271 el lugar susceptible de fosforilación. Recientemente los mismos autores han demostrado que la 5-LO también puede ser fosforilada *in vitro* por las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), concretamente por ERK2 a nivel de la Ser663 (155). La fosforilación de la 5-LO ya sea por la MK2 o la ERK2 se encuentra significativamente favorecida por la presencia de AA y según los autores de estos trabajos, pueden ser procesos que tengan lugar conjuntamente con el objetivo de activar la 5-LO (120,155). En la *Figura 6* se esquematiza la activación de la 5-LO tal y como estos autores han propuesto.

De entre las tres grandes familias de MAPKs, la vía de la MAPK p38 es la principalmente implicada en los procesos inflamatorios y por ello está considerada como diana farmacológica. Esta vía de señalización puede ser estimulada por un gran número de estímulos inflamatorios, factores quimiotácticos, ésteres de forbol y agentes movilizadores de Ca^{2+} y de estrés celular (156,157) dando lugar en macrófagos a procesos de quimiotaxis, adhesión, degranulación y explosión oxidativa. Se ha encontrado que tanto agentes exógenos como “agentes cebadores” que inducen la síntesis de LTs en leucocitos también están activando la vía de las MAPK p38 y de las MKs que actúan a niveles inferiores. Además estos estudios sugieren que la activación de esta vía es necesaria para que la 5-LO transloque a membrana (96,158). En la línea celular de linfoma B (BL41-E95-A) el estrés

celular es capaz de estimular la formación de productos derivados de la 5-LO de manera MAPK-p38 dependiente sin embargo, la administración de estímulos como el AA e ionóforo sólo producen un ligero aumento de la actividad 5-LO sin que se active la vía de la MAPK p38 (159). En condiciones de estrés celular sólo se observa una activación de la 5-LO y de esta vía de quinasas cuando a su vez las células se estimulan con AA exógeno más ionóforo (159,160).

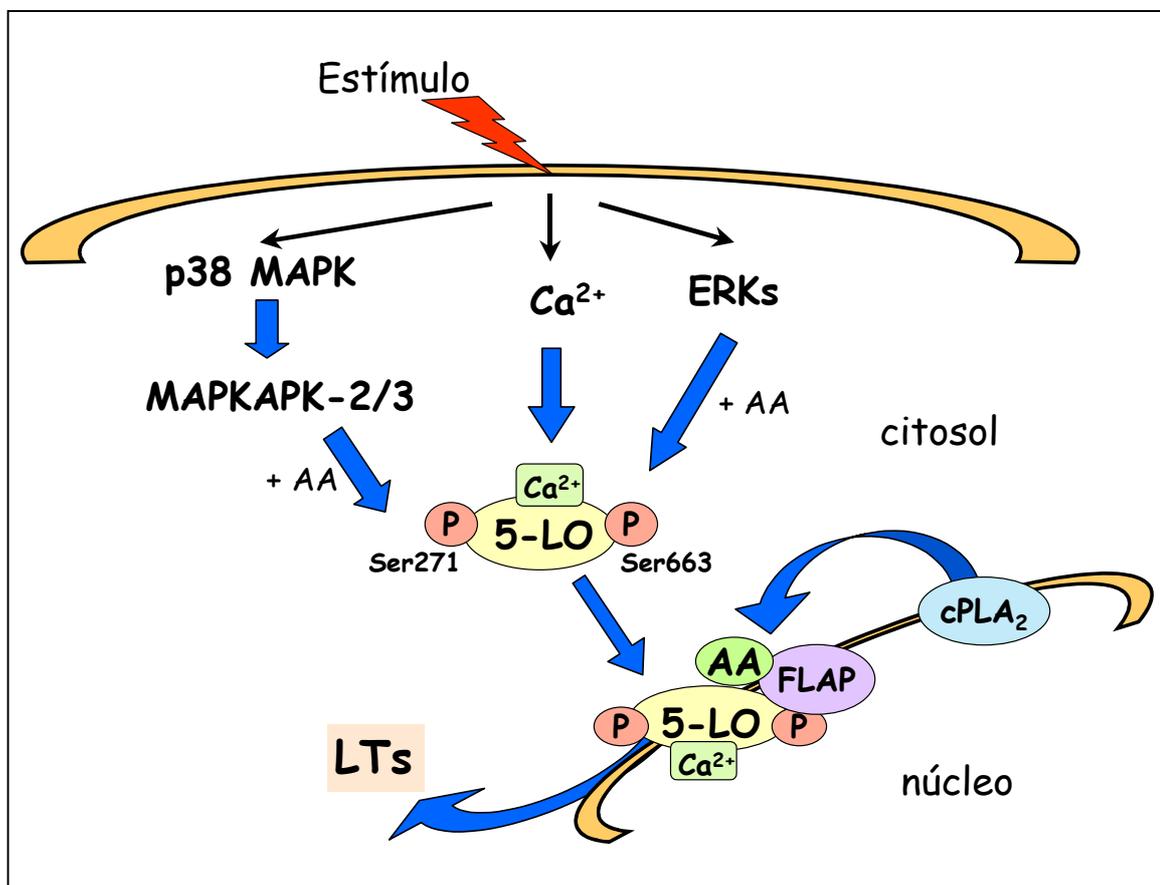


Figura 6. Activación celular de la 5-LO y síntesis de LTs. Determinados estímulos extracelulares producen un incremento intracelular de Ca²⁺ y la activación de las vías de las MAPK. Estos eventos también producen la translocación y activación de la cPLA₂ dando lugar a AA a partir de los fosfolípidos de la membrana nuclear. El AA libre puede activar la fosforilación de la 5-LO por las ERKs y las MAPKAPK-2/3. La 5-LO activada transloca a la membrana nuclear colocándose con su proteína activadora (FLAP). El AA libre es entonces transferido via FLAP a la 5-LO que lo transforma a LTs. Dependiendo del estímulo y del tipo celular, la activación de la 5-LO requerirá de la fosforilación y/o del incremento de Ca²⁺ intracelular.

8. Inhibidores endógenos de la vía de la 5-LO

Los mecanismos de inhibición endógena de la producción de LTs no han sido estudiados intensamente. Se ha demostrado que las glutatión peroxidasas dependientes de selenio actúan como potentes inhibidores de la actividad de la 5-LO a través de la reducción de los hidroperóxidos lipídicos (161,162). De hecho, en PMN la utilización de agentes que depleccionan el GSH como el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno o la diamida ha demostrado que existe un mecanismo regulador redox de la actividad de la 5-LO dependiente de este tipo de peroxidasas (161,163,164). Así, los leucocitos de ratas depleccionadas en selenio liberan 7 veces más productos derivados de la 5-LO que las ratas control (161). La selenoproteína fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PhGPx) es un enzima clave como antioxidante que protege a las biomembranas del estrés oxidativo. En linfocitos B, células mieloides inmaduras, la PhGPx es la principal responsable de la inhibición de la actividad de la 5-LO (83,160,162,165). También se ha observado que la activación de esta peroxidasa suprime la actividad 5-LO en células A431 (166) y que su sobreexpresión reduce los niveles de producción de LTs en células RBL-2H3 (167). Es importante destacar que el estrés oxidativo también activa la MAPK p38 y otras quinasas *downstream* de la vía de la 5-LO en células BL41-E95-A y que la inhibición de la MAPK p38 por el SB203580 reduce los niveles de peróxidos de hidrógeno inducidos por la actividad 5-LO (159). Así, se especula que los agentes pro-oxidativos podrían estar estimulando la actividad 5-LO de dos formas: promoviendo la fosforilación resultando en una actividad 5-LO insensible a peroxidasa y promoviendo la formación de la forma férrica de la 5-LO.

La adenosina también se ha sugerido que actúa como inhibidor endógeno. La adenosina es un nucleósido ubicuo con un gran espectro de acciones biológicas incluyendo la atenuación de la respuesta de los leucocitos por lo que se la ha considerado como un

potente agente antiinflamatorio. En concreto, la adenosina actúa a través de sus receptores $A_{2\alpha}$ produciendo un aumento en la concentración de AMPc intracelular ($[AMPc]_i$) e inhibiendo muchas de las funciones de los PMN humanos como son la formación de superóxido, la fagocitosis y la adhesión (168). Existen evidencias experimentales del impacto supresor de la adenosina sobre la vía de la 5-LO en concreto, tanto la adenosina endógena como los agonistas del receptor $A_{2\alpha}$ inhiben fuertemente la formación de LTB_4 en PMN aislados y en sangre total además, la utilización de adenosina deaminasa y de antagonistas específicos del receptor $A_{2\alpha}$ revierten esta inhibición e incrementan la síntesis de LTB_4 (169,170). El aumento en la $[AMPc]_i$ producido por la ocupación del receptor $A_{2\alpha}$ no sólo inhibe la liberación de AA (171) además, se ha descrito recientemente que el incremento de $[AMPc]_i$ producido por agentes como la adenosina, no sólo inhibe la síntesis de LTs sino que también impide la translocación de la 5-LO al núcleo en PMN estimulados (172).

El óxido nítrico (NO) es un importante regulador endógeno de diferentes procesos fisiológicos como son el control de la presión sanguínea, la neurotransmisión, la agregación plaquetaria y la acción citostática de los macrófagos (173). La importancia del NO radica principalmente en su bioquímica y en particular en su rápida conversión *in vivo* a especies reactivas derivadas del nitrógeno que dada su elevada capacidad de difusión e hidrofobicidad pueden interaccionar con una gran variedad de moléculas y enzimas. En el caso de las LOs, estas especies reactivas (posiblemente el peroxinitrito), interaccionan con las LOs y las inactivan reduciendo la forma férrica de la enzima a la forma ferrosa (174,175). Recientemente se ha observado que después de la estimulación de diferentes líneas celulares de mastocitos, la sintasa endotelial del NO transloca al núcleo de la célula (de igual modo que la 5-LO) donde la producción endógena de NO modula la producción de LTs en este tipo celular (176).

En la *Figura 7* se resumen los factores celulares que pueden llegar a modificar la actividad 5-LO.



Figura 7. Factores celulares que influyen sobre la actividad de la 5-LO.

III. Actividad biológica de los eicosanoides derivados de la 5-LO

Los productos con actividad biológica derivados de la vía biosintética de la 5-LO son básicamente el 5-HETE y los LTs (LTB₄ y cisteinil-LTs). Como ya se comentó anteriormente, el LTB₄ es un potente agente inflamatorio que estimula la migración, desgranulación, agregación y adhesión de los neutrófilos a las paredes postcapilares (8,27,28). El 5-HETE también es un importante mediador inflamatorio y del mismo modo que el LTB₄, estimula la migración de neutrófilos (177). Pero además, el 5-HETE puede

estimular la proliferación de células endoteliales (26) y de algunas líneas celulares cancerígenas (178,179). Por el contrario, a los cisteinil-LTs se les reconoce principalmente por ser potentes vasoconstrictores con capacidad para incrementar la permeabilidad vascular y la secreción de mucus (8,27,28). Sin embargo y como se verá más adelante, en la actualidad se les adscriben otras funciones biológicas importantes dentro del marco del remodelado tisular tales como la estimulación de la proliferación y la fibrogénesis.

La acciones biológicas de los LTs vienen determinadas por la unión a sus receptores específicos, son receptores ligados a proteínas G ya clonados y bien caracterizados. La existencia de receptores específicos para el 5-HETE es aún discutida. Los datos existentes hasta la fecha indican que las acciones del 5-HETE sobre los neutrófilos y una línea celular de cáncer de próstata están claramente indicando la presencia de un receptor ligado a proteínas G (180,181) y que este receptor podría estar codificado por un gen identificado recientemente (182). Sin embargo, la dificultad de estos estudios radica en que los HETEs a concentraciones μM son capaces de alterar la fluidez de la membrana plasmática y activar diferentes actividades enzimáticas sin la necesidad de interaccionar con receptores (183-187).

En los siguientes apartados se resumen las características funcionales básicas de los LTs y se centrarán en el papel de los cisteinil-LTs debido a su principal protagonismo en los trabajos presentados en esta tesis.

1. Receptores de los LTs

1.1. Receptores del LTB_4

Las acciones biológicas de los LTs están mediadas por receptores específicos. El LTB_4 ejerce sus efectos proinflamatorios a través de la unión a sus receptores de membrana BLT_1 y BLT_2 (Tabla 1).

TABLA 1. Características básicas de los receptores de membrana del LTB₄.

	BLT1	BLT2
Aminoácidos (humano)	352	358
Identidad entre humano y ratón	78.6%	92.7%
Expresión	↑Leucocitos, timo, bazo, pulmón	↑Bazo, ovario, hígado, leucocitos, ubícuo
Ligandos	LTB ₄ > 20-OH- LTB ₄ >> 12HETE	LTB ₄ > 12-HETE > 15HETE
Proteína G	G16, Gi2	Gq, Gi, Gz
Antagonistas	ONO 4057, U 75302	ONO 4057

Ambos receptores presentan siete dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G, su homología a nivel de estructura aminoacídica es alta (45%) pero presentan una distribución tisular bien diferenciada así como sensibilidades farmacológicas distintas. Se describe al receptor BLT₁ como de alta afinidad para el LTB₄ y aunque el BLT₂ está caracterizado por presentar una baja afinidad por su ligando, es capaz de transducir eficientemente las señales intracelulares en respuesta a LTB₄ (188). Además de la unión a estos receptores de membrana, el LTB₄ se une y activa un factor de transcripción en concreto, el receptor α activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR α) (189). Los datos existentes parecen indicar que el LTB₄ producido intracelularmente se une a este receptor nuclear y actúa como un estimulador de la transcripción de enzimas implicados en la inactivación de LTB₄ jugando un papel importante en el proceso de “aclaramiento” que tiene lugar durante la inflamación. De hecho, en el promotor de la LTB₄ ω -hidrolasa se han encontrado varios elementos de respuesta de los PPAR. Además, los ratones deficientes en PPAR α presentan una respuesta inflamatoria prolongada en el modelo de inflamación provocado por el AA de la oreja (189). El LTB₄ no es el único ligando para el PPAR α ,

otros ácidos grasos poliinsaturados incluyendo el 8S-HETE pueden unirse a este receptor (190,191).

1.2. Receptores de los cisteinil-LTs

Los cisteinil-LTs ejercen sus acciones biológicas a través de dos tipos de receptores localizados en la membrana celular, el CysLT₁ y el CysLT₂ (*Tabla 2*). Inicialmente y debido al papel clave de los cisteinil-LTs en enfermedades inflamatorias como el asma y la rinitis alérgica estos receptores se definieron basándose únicamente en los estudios funcionales y farmacológicos. Así, en 1995 la Unión Internacional de Farmacólogos clasificó a los receptores de cisteinil-LTs en dos grandes subtipos el CysLT₁ y el CysLT₂ (192), el primero se define como aquél capaz de ser bloqueado por los antagonistas clásicos como son por ejemplo el SK&F 104353 (pobilukast, Smithkline Beecham, King of Rusia, PA, USA), el ICI 204,219 (zarfirlukast, Zeneca, Macclesfield, UK), el MK-571 (Merck, Pointe-Clair Dorval, Canada) y el MK-476 (montelukast, Merck). Así, si bien el Cys-LT₂ se caracteriza por no responder al bloqueo con estos “antagonistas clásicos” actualmente existe un antagonista dual el BAY u9773 (Bayer, Leverkusen, Alemania) que a pesar de no ser muy potente ni selectivo sobretodo a nivel de tejidos humanos puede ayudar a establecer el patrón de expresión del Cys-LT₂. Existen también indicaciones de la existencia de subclases de receptores Cys-LT₁ y Cys-LT₂ y se ha sugerido la existencia de un tercer subtipo de receptor de cisteinil-LTs ya que tanto en el parénquima pulmonar del hombre como en el de la cobaya existen receptores resistentes tanto a los antagonistas clásicos como al BAY u9773 (193). Hace pocos años que ambos receptores fueron clonados por diferentes grupos simultáneamente (194-198). Estos resultados han apoyado la nomenclatura y clasificación inicial de estos receptores y además han facilitado el

desarrollo de estudios para el conocimiento de los mecanismos de transducción de señal (199).

El patrón de expresión de estos receptores se determinó inicialmente mediante estudios de unión a ligando o estudios de caracterización funcional utilizando los “antagonistas clásicos” y el antagonista dual BAY u9773 en preparaciones tisulares. Sin embargo, la ausencia de antagonistas específicos hacía que la interpretación de estos resultados fuera harto ambigua y difícil. No ha sido hasta el clonaje de ambos receptores y tras la aplicación de técnicas como el Northern blot, la hibridación *in situ*, la inmunohistoquímica y la RT-PCR que se ha establecido con mayor exactitud la expresión de estos receptores en muestras humanas (ver *Tabla 2*).

TABLA 2. Características básicas de los receptores de membrana de los cisteinil-LTs

	Cys-LT ₁	Cys-LT ₂
Aminoácidos (humano)	337	346
Identidad entre humano y ratón	87.3%	65%
Expresión tisular	Bazo > intestino delgado, próstata, timo, pulmón,	Corazón, placenta, glándula adrenal bazo > riñón, ovario, cerebro
Expresión celular	Leucocitos, cél. musculares lisas pulmonares, macrófagos pulmonares intersticiales, mastocitos, células HL60, U937 y THP1	Leucocitos, macrófagos pulmonares intersticiales, miocitos y fibroblastos cel. Musculares lisas y endoteliales del corazón, HUVEC, >>cél. musculares lisas pulmonares
Ligandos	LTD ₄ >> LTC ₄ ≥ LTE ₄	LTD ₄ = LTC ₄ > LTE ₄
Proteína G	Gαq	Gαq
Antagonistas	zafirlukast (Accolate™), montelukast (Singulair™), pranlukast (Onon™), pobilukast, MK-571, MK-476, BAY u9773	BAY u9773 (agonista parcial)

El patrón de expresión observado de los receptores Cys-LT₁ y Cys-LT₂ varía entre tejidos y entre especies (200,201). En humanos, y tal y como se observa en la *Tabla 2*, ambos receptores se coexpresan en pulmón tanto a nivel de las células musculares lisas de los bronquios como a nivel de los macrófagos intersticiales así como en bazo y en leucocitos de sangre periférica.

En tejidos como corazón, placenta, glándula adrenal y cerebro la expresión es exclusiva del receptor Cys-LT₂ sin embargo, su función en estos territorios está aún por determinar (202,203). En comparación con el receptor Cys-LT₁, el receptor Cys-LT₂ se encuentra débilmente expresado en las células musculares lisas de pulmón mientras que su expresión a nivel de los macrófagos intersticiales adyacentes es muy elevada (194).

Actualmente no existen muchos estudios sobre la regulación de la expresión de estos receptores. Se ha observado que la diferenciación celular *in vitro* puede incrementar la expresión de estos receptores, por ejemplo en células U937 diferenciadas por DMSO incrementan los lugares de unión para el LTD₄ (204) así como en células HL60 diferenciadas a eosinófilo (205). Asimismo, varias citoquinas implicadas en la patogénesis del asma son capaces de incrementar la expresión del receptor Cys-LT₁ *in vitro*, la IL-5 en células HL-60 diferenciadas a eosinófilo (205), la IL-13 y la IL-4 pero no el INF- γ en monocitos y en macrófagos humanos (206). Sin embargo el INF- γ es capaz de inducir la expresión de ambos receptores en células musculares lisas de pulmón humanas (207). Además, la IL-1 β puede inducir la expresión del mRNA del receptor Cys-LT₁ en células HUVEC (208).

Vías de señalización intracelular

Ambos receptores presentan 7 dominios hidrofóbicos transmembrana típicos de los receptores ligados a proteínas G. No existe sin embargo, ningún modelo de la unión de los

cisteinil-LTs a sus receptores. Basándose en la estructura del ligando estos receptores se han clasificado dentro de la subfamilia de receptores semejantes a los receptores rhodopsina/ β 2 adrenérgicos.

En cada uno de los estudios de clonaje de ambos receptores, se ha determinado su función mediante la cuantificación *in vitro* de la movilización de Ca^{2+} intracelular en células transfectadas con el cDNA del receptor CysLT₁ o con el cDNA del receptor CysLT₂, y los resultados han confirmado los estudios farmacológicos reportados previamente (192). Así, los cisteinil-LTs incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular con un rango de potencia para el receptor CysLT₁ de $\text{LTD}_4 > \text{LTC}_4 \geq \text{LTE}_4$ y para el receptor CysLT₂ de $\text{LTD}_4 = \text{LTC}_4 > \text{LTE}_4$ (202).

A pesar de la potente actividad biológica de los cisteinil-LTs poco se sabe de las señales intracelulares que se producen al interaccionar con sus receptores. Existen algunos datos sobre los mecanismos de transducción de señal a través del receptor Cys-LT₁. Tanto en células HEK-293 como en oocitos de xenopus transfectados con el receptor Cys-LT₁, la respuesta producida por el LTD₄ no se ve alterada por la toxina pertusis indicando que en estas células este receptor sólo se acopla a proteínas G de la familia G_{q/11}. Sin embargo, en células humanas diferenciadas U937, células intestinales 407 y células THP-1 se ha observado que este receptor se puede acoplar tanto a miembros de la familia G_{q/11} como a miembros de la familia G_{i/o}. Todos estos resultados parecen indicar que las vías de señalización del receptor Cys-LT₁ dependen no sólo del tipo celular sino también de la disponibilidad de proteínas G y explicarían a su vez la versatilidad funcional del LTD₄ en macrófagos y en células epiteliales bajo estímulos inflamatorios o condiciones de alergia. Poco se sabe sobre la secuencia de acontecimientos que tiene lugar después de la interacción con las proteínas G. En células THP-1, el LTD₄ induce la activación de la MAPK a través de la vía de la PKC α y Raf-1 (209). En células U937, la activación del

receptor también incrementa la actividad de la topoisomerasa I a través de la PKC (210). Recientemente se ha observado que el efecto proliferativo del LTD₄ sobre células del epitelio intestinal tiene lugar a través dos vías: una vía independiente de Ras pero dependiente de la activación de la PKC ϵ , en la que se produce la activación de las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (Erk-1/2) y una vía paralela dependiente de la activación de Ras (211). Es importante señalar que los cisteinil-LTs podrían actuar de forma intracrina e interactuar con receptores intracelulares. En concreto, en eosinófilos se ha descrito que el LTC₄ endógeno actúa como mediador intracelular de la liberación de IL-4 por estas células (212).

2. Acciones biológicas de los cisteinil-LTs

Dentro del abanico de propiedades biológicas de los cisteinil-LTs, las más estudiadas son las relacionadas con el asma en humanos. Esto es debido a que estos eicosanoides juegan un papel fundamental en el desarrollo de la obstrucción e inflamación pulmonar observada en el asma (200). No sólo son potentes broncoconstrictores sino que además incrementan la permeabilidad vascular favoreciendo la aparición de edema pulmonar, también incrementan la secreción de mucus y disminuyen su eliminación deteriorando la capacidad ciliar del epitelio pulmonar (213-215). De hecho, desde 1995, la industria farmacéutica está desarrollando con éxito toda una serie de compuestos contra los efectos producidos por los cisteinil-LTs en el asma (ver *Tabla 2*). A continuación se desglosan los efectos más importantes de estos eicosanoides.

2.1. Contracción del músculo liso de las vías respiratorias

La primera propiedad biológica que se le atribuyó a los cisteinil-LTs antes incluso de conocer su estructura, cuando se les conocía como SRS-A, fue la capacidad para contraer las células musculares lisas de los bronquios tanto *in vivo* como *in vitro* (216,217). De hecho, juegan un papel clave en el asma siendo el LTD₄ aproximadamente 1000 veces más potente que la histamina (217). Los experimentos realizados *in vivo* tanto en sujetos sanos como en asmáticos demuestran que la inhalación de cisteinil-LTs es capaz de producir broncoconstricción (218,219). Además, el receptor Cys-LT₁ parece ser el responsable de este efecto, pues la administración de antagonistas como el zafirlukast o el montelukast revierte la vasoconstricción e incluso parece inducir una aparente broncodilatación (220,221). En el asma crónico el bronquio presenta un incremento en el tono contráctil lo que se supone que es debido tanto a la hiperplasia del músculo liso como al incremento en la liberación de cisteinil-LTs (222,223). Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias directas de la sobreexpresión del Cys-LT₁ en los bronquios de estos asmáticos. Si esto fuera así, también explicaría el porqué los asmáticos presentan una respuesta mayor a los cisteinil-LTs que los individuos sanos (224).

De entre los tres cisteinil-LTs, el LTE₄ demuestra ser el menos potente en diferentes sistemas *in vitro* (193,225) lo que hace suponer que actúa como un agonista parcial pues habitualmente se une a los receptores del LTD₄. Sin embargo, se ha sugerido que en la tráquea de la cobaya el LTE₄ se une solamente a un subtipo de receptores Cys-LT₁ (226). Tanto el parénquima pulmonar como los bronquios humanos se contraen después de la administración de cisteinil-LTs. A diferencia de lo que ocurre en el parénquima pulmonar de la cobaya, en el tejido humano los cisteinil-LTs no inducen la formación de tromboxano A₂ que es también un potente vasoconstrictor (193).

2.1. Acciones vasoactivas en el músculo liso de territorios extrapulmonares

Los primeros estudios *in vitro* con preparaciones pulmonares humanas demostraban que los cisteinil-LTs no sólo eran capaces de contraer el músculo liso de las vías respiratorias sino también el de las venas pulmonares y en menor medida el de las arterias pulmonares (227,228). Posteriormente se demostró que el LTC₄ y el LTD₄ eran capaces de contraer vasos humanos de otros territorios como es la vena sefana (229). En general, no ocurre así con preparaciones vasculares de distintos animales de experimentación pues éstas tienen muy poca capacidad para contraerse en respuesta a los cisteinil-LTs (230,231). En las venas pulmonares humanas y al contrario de lo que ocurre en las vías respiratorias la contracción inducida por los cisteinil-LTs no se ve afectada por los antagonistas selectivos del receptor Cys-LT₁ lo que hace suponer la presencia de otros receptores como es el Cys-LT₂ u otros subtipos en las células musculares lisas de este territorio vascular. Recientemente también se ha demostrado que los antagonistas MK-571 y BAY u9773 son incapaces de inhibir la contracción de las arterias pulmonares de cerdo, por lo que se ha sugerido la existencia de otro tipo de receptor asociado a la respuesta en este tejido (232).

Paradójicamente los cisteinil-LTs también son capaces de relajar el músculo liso vascular aunque este efecto es dependiente de endotelio. Los pocos datos presentados hasta la fecha sugieren que la relajación producida por los cisteinil-LTs es debida a la estimulación de los receptores existentes en el endotelio vascular (233). Tanto el LTC₄ como el LTD₄ son capaces de producir la relajación de las arterias pulmonares y torácicas de la cobaya, efecto que es bloqueado por un antagonista de los LTs sugiriendo la existencia de un único receptor (234,235). Los resultados obtenidos con arterias y venas pulmonares humanas indican que mientras el endotelio de las arterias expresa el receptor

Cys-LT₂ y su activación induce la liberación de NO, el endotelio de las venas pulmonares humanas presenta tanto el receptor Cys-LT₁ como el Cys-LT₂ de forma que la activación del primero induce la liberación de factores contráctiles (236,237). Datos más recientes demuestran que en el endotelio de la arteria pulmonar existe un receptor insensible tanto a los antagonistas clásicos como al BAY u9773 cuya activación produce la relajación de la arteria mediante la liberación de prostaciclina (232). Así, aparentemente existen dos vías responsables del efecto relajador de los cisteinil-LTs, una de ellas implica a los metabolitos del AA derivados de la COX y la otra a la producción de NO (229,237,238).

2.3. Efectos cardiovasculares

Los cisteinil-LTs también están implicados en la fisiopatología cardiovascular. En numerosas especies estos LTs son potentes vasoconstrictores de las arterias coronarias (239-241). Sus efectos parecen estar asociados a sucesos isquémicos en el miocardio tales como el infarto (242) y la “anafilaxis cardíaca” (243). Además, en modelos experimentales de isquemia cardíaca, los inhibidores de la 5-LO y los antagonistas de los cisteinil-LTs, son capaces de reducir el tamaño del infarto y las arritmias inducidas por la reperfusión (244,245). En pacientes con enfermedad coronaria arterial existe un incremento en la producción de cisteinil-LTs (246,247). Además se ha observado que tanto el LTC₄ como el LTD₄ inducen la contracción de arterias coronarias arterioscleróticas pero no en las procedentes de sujetos sin arterioesclerosis. Los lugares de unión específicos para el LTC₄ aparecen en las células musculares lisas y en las regiones de proliferación de la íntima y de la formación de la placa (248). También se ha observado que los cisteinil-LTs pueden modular los efectos de otros agentes vasculares vasoactivos. Los cisteinil-LTs son capaces de incrementar el efecto vasoconstrictor de la angiotensina II sobre la aorta tanto en ratas con hipertensión espontánea (249) como en ratas diabéticas (250). Este efecto modulador

de los cisteinil-LTs parece ser específico pues no producen ningún resultado sobre los efectos de la endotelina-1 en el modelo de ratas hipertensas (251).

2.4. Remodelado tisular e inflamación

Durante los procesos inflamatorios crónicos que pueden tener lugar en un tejido, se desencadenan toda una serie de cambios estructurales que terminan por alterar la estructura original del tejido en un proceso denominado remodelado tisular. En el caso concreto del asma, esto se manifiesta por un incremento de la masa de células musculares lisas, fibrosis subepitelial y acumulación de proteínas de matriz extracelular. También se produce daño en las células epiteliales e hiperplasia de las células productoras de mucus, así como la infiltración de eosinófilos en el epitelio y la submucosa y la producción de citoquinas (252-254). Los cisteinil-LTs pueden jugar un importante papel en este proceso a través de su acción sobre las células musculares lisas, los eosinófilos, las células epiteliales y otros posibles tipos celulares. En este sentido, las evidencias experimentales son numerosas, entre ellas destaca la acción proliferativa de los cisteinil-LTs sobre algunos tipos celulares tales como fibroblastos (255), células endoteliales (256), células epiteliales (257,258) y células musculares lisas (259). En el caso de estas últimas, se ha observado que los cisteinil-LTs en conjunción con otros mitógenos causan tanto la proliferación como la hiperplasia de estas células (260-262). Por ejemplo, el LTD₄ no tiene efectos sobre la síntesis de DNA en células HASM pero aumenta la proliferación producida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) cuya producción está elevada en el asma (260). Este efecto además puede ser bloqueado por los antagonistas pranlukast y pobilukast pero no por el zafirlukast (262). También se ha observado *in vitro* que el LTC₄ estimula la producción de colágeno por fibroblastos pulmonares de rata (263). En un modelo experimental de asma provocado en el ratón, el antagonista del receptor Cys-LT₁ (montelukast), revierte

significativamente casi todas las anomalías morfológicas que aparecen en el asma crónico (264). En el pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, otro tipo de enfermedad pulmonar que cursa con un remodelado tisular intenso, se ha observado una activación constitutiva de la 5-LO (265). Además, los ratones deficientes en 5-LO presentan una reducción significativa del grado de fibrosis inducida por la bleomicina (266). En los ratones deficientes en la LTC₄ sintasa (incapaces de sintetizar cisteinil-LTs), también se ha observado una reducción importante de los procesos inflamatorios y fibróticos pulmonares inducidos por la bleomicina mientras que en los ratones deficientes en el receptor Cys-LT₁ (sobrexpresan cisteinil-LTs), estos procesos se encuentran agravados (267). Estos resultados se suman a las evidencias anteriormente descritas y apoyan este nuevo papel funcional de los cisteinil-LTs distinto de su acción vasoconstrictora.

Los eosinófilos son uno de los principales tipos celulares reclutados hasta los lugares de inflamación alérgica y participan de forma muy activa en la patogénesis de la inflamación crónica que tiene lugar en el asma y otros trastornos alérgicos (268). Los cisteinil-LTs en las vías respiratorias son producidos de forma muy rápida y al comienzo del asma alérgico principalmente por los eosinófilos pero también por los mastocitos y posiblemente por los macrófagos alveolares. En los pacientes asmáticos, el incremento de cisteinil-LTs que se observa en el lavado broncoalveolar y en la orina podría estar asociado a un mayor número de eosinófilos y a un aumento de su actividad (222,223). Se sabe que los eosinófilos expresan receptores Cys-LT₁ y Cys-LT₂ en su superficie (194,269) y existen numerosas evidencias que indican el posible efecto autocrino de estos eicosanoides sobre estas células. La inhalación de LTD₄ en la cobaya produce de manera dosis dependiente una infiltración de eosinófilos que persiste hasta la cuarta semana y que puede ser bloqueada por el pranlukast (270). También en pacientes asmáticos la inhalación de cisteinil-LTs incrementa el porcentaje de eosinófilos tanto en la mucosa bronquial (271)

como en el esputo después de 4h de la inhalación (272). La eosinofilia inducida en el mono puede reducirse mediante la administración de un antagonista del Cys-LT₁ (273). De hecho, en el ratón deficiente en el gen de la 5-LO y después de la inducción experimental de asma existe una reducción del 50% en el número de eosinófilos de las vías aéreas (274).

El reclutamiento de eosinófilos es el resultado combinado de varios factores entre los que se encuentran, un incremento en la maduración y movilización desde la médula ósea hasta la circulación sanguínea, la quimiotaxis hacia los lugares de acción, un incremento de la interacción con las células endoteliales vía un incremento en moléculas de adhesión, la interacción con proteínas de matriz extracelular y el incremento de la supervivencia celular (275). Los cisteinil-LTs actúan como agentes quimiotácticos para los eosinófilos via el receptor Cys-LT₁ (276). También inducen la expresión de P-selectina tanto en leucocitos y células endoteliales e incrementan tanto el *rolling* como la adhesión de los eosinófilos a los vasos (277,278). Además se ha observado que los cisteinil-LTs son importantes para mantener la supervivencia de los eosinófilos de forma tan importante como el GM-CSF y la fibronectina (279). La producción de cisteinil-LTs se estimula por la acción de citoquinas como el GM-CSF y la IL-5 pero también por la adhesión a la superficie endotelial a través de ICAM-1 (280) o la adhesión a proteínas de matriz a través del VLA-4 (281) lo que a su vez estimula la secreción de más citoquinas y moléculas de adhesión en los eosinófilos. Resultados similares se obtienen en mastocitos humanos estimulados con IL-4 donde los cisteinil-LTs estimulan la secreción de IL-5, TNF- α , y la MIP-1 β posiblemente a través del receptor Cys-LT₁ (282). De hecho, el inhibidor pranlukast (ONO-1078) inhibe muchas de las funciones efectoras de los eosinófilos humanos activados por el PAF (283). Estos estudios demuestran que el receptor Cys-LT₁ puede estar *up*-regulado por varias citoquinas y moléculas de adhesión e incluso por los mismos cisteinil-LTs potenciando así sus efectos de manera autocrina.

2.5. Otros efectos de los cisteinil-LTs

2.5.1. Modulación neuroendocrina e inflamación neuronal

Estudios realizados en la década de los 80 sugerían un papel neuromodulador de los cisteinil-LTs. En este sentido, los estudios *in vitro* demostraban que muchas de las regiones del cerebro de la rata eran capaces de producir cisteinil-LTs bajo estímulos como el ionóforo A23187 siendo la zona del hipotálamo y de la eminencia media las mayores productoras (284,285). También se localizaron lugares de unión al LTC₄ en diferentes regiones del cerebro de la rata (286). De hecho, los experimentos realizados en la rata tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que el LTC₄ era capaz de estimular la liberación de la hormona luteneizante (LH) por las células de la pituitaria anterior (287) y la liberación de la hormona liberadora de la hormona luteneizante (RHLH) por la eminencia media (288). Sin embargo, los antagonistas del Cys-LT₁ no inhibían el efecto liberador de RHLH por el LTC₄. Estos estudios también demostraron que el efecto era específico para la LH y la RHLH ya que la secreción de la hormona del crecimiento, la somatostatina o el factor liberador hormonal no se encontraban afectados. Hasta la fecha no se han descrito efectos de los cisteinil-LTs sobre el eje hipotálamo-pituitaria-glándula adrenal.

Además del posible efecto neuromodulador de los cisteinil-LTs éstos también están relacionados con la inflamación neuronal. De hecho, se ha detectado un incremento en la producción de estos eicosanoides en el fluido cerebroespinal de pacientes con esclerosis múltiple y en la hemorragia intracerebral (289,290), hecho que se asocia a un empeoramiento de la enfermedad y la aparición de edema neuronal. También se ha descrito recientemente que con el paso del tiempo, existe un incremento de la expresión de la 5-LO neuronal hecho que se correlaciona con el desarrollo de desórdenes degenerativos (291-293). Sin embargo, el papel de los metabolitos derivados de la 5-LO en la

neurodegeneración está aún por determinar siendo muy posible que este efecto se derive de la acción no enzimática de la 5-LO (291).

2.5.2. Permeabilidad vascular

Otro de los efectos de los cisteinil-LTs en el asma incluye su capacidad para incrementar la permeabilidad microvascular contribuyendo así a la formación de edema pulmonar (214,294). Los estudios realizados en la cobaya indican que el LTD₄ induce un incremento de la extravasación de plasma en las vías respiratorias siendo más potente que la histamina pero menos eficiente que el PAF (295-297). El mecanismo relacionado con la permeabilidad vascular se asocia a la contracción de las células endoteliales a nivel de las vénulas postcapilares lo que da como resultado la aparición de “huecos” a través del endotelio de las vénulas (294). Además este efecto parece estar mediado por el receptor Cys-LT₁ tal y como lo demuestran los estudios farmacológicos (298,299) y el más recientemente publicado que utiliza ratones *knockout* para este receptor (300).

2.5.3. Secreción de mucus

De nuevo volvemos al contexto de la enfermedad asmática pues también se ha descrito aunque de forma más limitada, que los cisteinil-LTs pueden incrementar la secreción de mucus en las vías respiratorias. En concreto, los experimentos *in vitro* demuestran que la administración de LTD₄ a explantes procedentes de la mucosa pulmonar humana estimula significativamente la liberación de aminoazúcares procedentes de las glicoproteínas de la mucosa (215,301). Este efecto también ha sido demostrado *in vivo* después de la inhalación de LTC₄ y LTD₄ en la cobaya, el gato y el perro (302-304) y parece estar mediado por el receptor Cys-LT₁. Además, en la oveja se ha observado que el

LTD₄ disminuye el transporte de mucus (305) y que en el hombre inhibe la actividad ciliar pulmonar (213).

3. Inhibición farmacológica de la biosíntesis de LTs

Dada la importancia de los LTs como agentes fisiopatológicos en una gran variedad de enfermedades alérgicas e inflamatorias, existe un gran interés por desarrollar terapias dirigidas a controlar tanto la biosíntesis como la acción de estos eicosanoides. Hoy en día la terapia anti-LTs se aplica siguiendo dos estrategias farmacológicas básicas: la supresión de la síntesis de LTs y el uso de antagonistas de los receptores de LTs. La síntesis puede ser suprimida actuando a diferentes niveles: (I) mediante la inhibición de las fosfolipasas impidiendo la liberación del precursor de LTs, el AA, (II) mediante la inhibición de la 5-LO o (III) la inhibición de la FLAP.

3.1. Inhibición de la disponibilidad de substrato

Durante mucho tiempo se asumió que la inhibición de las fosfolipasas mediante compuestos como los glucocorticoides suprimía totalmente la síntesis de eicosanoides. De hecho, esto ha sido corroborado por los experimentos realizados con el ratón *knockout* de la cPLA₂ (142,143). Sin embargo, en humanos, la administración de altas dosis de glucocorticoides, no reduce significativamente los niveles de LTs (306). Además, *in vitro* se ha observado que producen un incremento de la expresión de la 5-LO y de la FLAP (76,307). Por este motivo, los glucocorticoides se consideran inefectivos para reducir los niveles de LTs *in vivo*.

3.2. Inhibición directa de la 5-LO

Los inhibidores directos de la 5-LO se pueden subdividir en tres grupos: compuestos con actividad redox, ligandos del hierro con débil actividad redox e inhibidores competitivos no-redox.

Compuestos con actividad redox:

Los primeros compuestos identificados como inhibidores directos de la actividad 5-LO fueron los agentes reductores lipofílicos con capacidad para reducir el lugar activo del hierro desacoplando así el ciclo catalítico de la enzima (308). Entre éstos se encuentran compuestos fenólicos como el ácido nordihidroguarético, el ácido cafeico, los flavonoides y las coumarinas y compuestos como la fenidona (309,310). Sin embargo, estas sustancias poseen muy poca selectividad para la 5-LO y causan importantes efectos secundarios (ej., formación de metahemoglobina) dada su interacción con otros sistemas biológicos redox o por la producción de especies radicales reactivas (311). El desarrollo de potentes inhibidores orales con débiles propiedades redox dio lugar al AA-861, el BW755C o el ICI-207968 pero también manifiestan no ser tan específicos y causar efectos secundarios (310). Por ejemplo, el más utilizado de estos últimos es el AA-861 desarrollado por Takeda Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Es un potente inhibidor competitivo de la 5-LO y no tiene ningún efecto sobre las actividades 12-LO y COX por debajo de la concentración de 10 μ M.

Ligandos del hierro:

Los compuestos que actúan como ligandos del hierro son potentes inhibidores de la 5-LO ya que a través de sus grupos hidroxamínicos o N-hidroxiurea quelan el lugar activo del hierro. Por ejemplo, el compuesto BW-A4C es un miembro de los ácidos hidroxamínicos que actúa como inhibidor selectivo de la 5-LO presentando una IC_{50} de 40 nM en granulocitos estimulados (312) sin embargo, sufre una rápida inactivación

formándose radicales nitróxidos muy tóxicos. Esto dio lugar al desarrollo por los laboratorios Abbot de un compuesto más estable derivado de la N-hidroxiurea el A-64077, más conocido como ziflutón (313). El ziflutón fue el primer inhibidor de la síntesis de LTs de eficacia clínica en humanos, de hecho está disponible en Estados Unidos desde 1997 para el tratamiento del asma. El ziflutón inhibe de forma consistente la inducción de la síntesis de LTs en una gran variedad de tipos celulares animales (rata, ratón, cobaya, mono) y humanos con valores de IC_{50} entre 0.5 y 1 μ M careciendo de capacidad para inhibir las actividades 12- y 15-LO (313,314). Los estudios clínicos demostraron que el ziflutón causaba una mejora sustancial de las funciones de las vías respiratorias reduciendo los síntomas febriles del asma y disminuyendo la necesidad de la administración de agonistas β -o de glucocorticoides (315). El ziflutón muestra una clara eficacia no sólo en el asma sino también en la rinitis alérgica, la artritis reumatoide y en la enfermedad inflamatoria intestinal (316). En la colitis ulcerosa el ziflutón es efectivo pero no tiene ninguna ventaja terapéutica respecto a otras terapias convencionales. La segunda generación de compuestos derivados de la N-hidroxiurea ha tratado de solventar las desventajas del ziflutón como son su corta vida media después de la administración por vía oral (3 horas) y la elevada dosis efectiva. Así, el ABT-761 inhibe la actividad de la 5-LO en neutrófilos con una IC_{50} de 23 nM (317). Además, en modelos animales de broncoespasmo este compuesto es 5 veces más potente que el ziflutón y tiene una vida media de hasta 16 horas (317). También reduce la excreción urinaria de LTE_4 en la broncoconstricción inducida por el ejercicio en pacientes asmáticos (318)).

Otro compuesto de la serie de N-hidroxiureas actualmente en fase II para el tratamiento del asma es el LDP-977 (CMI-977). Es un potente inhibidor oral de la actividad 5-LO con valores de IC_{50} de 120 nM en sangre total y de 100 nM las vías respiratorias (inhibición de la contracción inducida por IgE). Es de 5 a 10 veces más

potente que el ziflutón y parece demostrar una mayor vida media por lo que tan sólo sería necesario una dosis diaria (199).

Inhibidores competitivos no-redox:

Los inhibidores no-redox compiten con el AA por la unión al lugar activo de la 5-LO. Entre este tipo de inhibidores se encuentran compuestos de la serie de metoxialquiltiazoles y metoxitetrahidropiranos (319-321). El ZM211965 es muy potente *in vitro* con IC_{50} de 8 nM en macrófagos de ratón y de 400 nM en sangre total humana (322). Sin embargo, *in vivo* este tipo de compuestos presenta una capacidad de inhibición moderada debido a su baja solubilidad en agua y vida media muy cortas. La optimización de la estructura de estos compuestos a dado lugar al desarrollo del ZD2138 y su análogo ZM230487 que además de ser 10 veces más potentes que el ZM211965 en sangre total (IC_{50} 20-50 nM) mejoran su actividad después de la administración por vía oral (319). La empresa farmacéutica Merck también ha conseguido obtener compuestos de estructura híbrida muy potentes y activos oralmente entre los que destaca el L-697,198 el cual inhibe la síntesis de LTB_4 en PMN humanos con una IC_{50} de 1.5 nM (323).

Sin embargo, el ZD2138 a pesar de ser muy potente en muchos modelos *ex vivo* e *in vitro* es incapaz de suprimir la generación de LTs en los lugares de inflamación crónica (324,325). Además, en ensayos funcionales *in vivo* se requieren concentraciones muy superiores a las utilizadas *ex vivo* para obtener resultados comparables (326). Por ejemplo, en pacientes asmáticos el ZD2138 no protege de la respuesta asmática inducida (327) y es incapaz de prevenir la inflamación o el desarrollo hiperrespuesta pulmonar (325). Es importante destacar que la inhibición de la 5-LO por este tipo de compuestos (ej., ZD230487) claramente se ve disminuida cuando existe un ambiente de estrés oxidativo y un incremento de los niveles de peróxidos (328). El análisis de la cinética de inhibición del ZD230487 muestra una inhibición competitiva de la 5-LO bajo condiciones no reductoras

mientras que este compuesto actúa como un inhibidor no competitivo cuando el nivel de hidroperóxidos es bajo. Así, se considera que los inhibidores no-redox de la 5-LO son potentes inhibidores de la síntesis de LTs cuando el nivel de peróxidos es bajo. Esta podría ser una de las causas de la reducida eficacia del ZD2138 en los procesos fisiopatológicos ya que durante las reacciones inflamatorias se produce un incremento significativo en los niveles de peróxidos.

Una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias se basa en el diseño de inhibidores duales capaces de inhibir las actividades 5-LO y COX. Entre este tipo de inhibidores se encuentra el ML-3000 (Licofelona) que ha entrado en fase III en el tratamiento de la osteoartritis. Este compuesto inhibe la 5-LO en granulocitos humanos y bovinos con una IC_{50} de 0.23 y 0.18 μ M respectivamente (329).

También queda por describir el mecanismo de inhibición de la 5-LO que produce el isómero del ácido boswélico el ácido acetil-11-ceto-boswélico (AKBA). Este compuesto actúa directamente sobre la 5-LO en un lugar diferente del lugar catalítico del AA (330,331), tiene una IC_{50} en PMN humanos intactos de 1.5 μ M y no tiene efectos sobre las actividades COX ni otras LOs.

3.3. Inhibición de la FLAP

Durante la búsqueda de compuestos indol derivados de los inhibidores de la COX como la indometacina y el sulindac, Merck desarrolló el primer inhibidor de la FLAP de evaluación clínica, el MK-886 (332). El MK-886 inhibe la generación de derivados de la 5-LO en leucocitos intactos (IC_{50} , 2.5 nM) pero es menos eficiente en sangre total (IC_{50} , 1.1 μ M) y lo que es más significativo, es incapaz de suprimir la actividad 5-LO cuando se utiliza la 5-LO purificada o cuando se añade a una preparación de células disgregadas

(332). La administración oral de MK-886 a individuos asmáticos sólo disminuye la producción *ex vivo* de LTB₄ en sangre total y los niveles de LTE₄ en orina un 50% (333).

También se han desarrollado otro tipo de compuestos de estructura quinolina o estructura híbrida entre la quinolina y el indol capaces de unirse a la FLAP e inhibir la biosíntesis de LTs en células intactas (333-337). El compuesto de estructura quinolina Bay-X-1005 es un potente inhibidor de la síntesis de LTs desarrollado por Bayer AG para el tratamiento del asma (338,339). Inhibe la síntesis de LTs en leucocitos aislados de rata (IC₅₀, 26 nM) y leucocitos humanos (IC₅₀, 220 nM) (340). También disminuye la formación de LTs en las vías respiratorias (341) así como la broncoconstricción y la síntesis de LTs provocada por alérgenos en individuos asmáticos (342). Además, la unión de Bay-X-1005 a la FLAP se correlaciona con la inhibición de la síntesis de LTB₄ (343). El MK-0591 representó la segunda generación de inhibidores indol desarrollada por Merck (344). Este compuesto es un híbrido indol/quinolina que al igual que el MK-886, bloquea la actividad 5-LO uniéndose a la FLAP e impidiendo la translocación y activación de la 5-LO. Es un potente inhibidor de la biosíntesis de LTs tanto *in vivo* como *in vitro* (333-335) pero en los *trials* clínicos con asmáticos no ha demostrado ser muy eficaz (333).

Los inhibidores de la FLAP MK-886, Bay-X- 1005 y MK-0591 inhiben de forma muy potente la síntesis de LTs en PMN aislados humanos pero en los ensayos con sangre total estas drogas bajan su efectividad de 50 a 200 veces (333-335,340). La reducida eficacia de estos compuestos en ensayos con sangre total podría explicarse por la existencia de proteínas en el plasma que se unen a estas drogas o por la competición de estas moléculas con el AA u otros ácidos grasos poliinsaturados en *cis* por la unión a la FLAP (85,87). De hecho, la adición de AA a granulocitos estimulados con ionóforo o a linfocitos B reduce la eficacia del MK-886 al comparar con las células control estimuladas únicamente con ionóforo o cuando se limita la disponibilidad de sustrato (83,84).

Globalmente se podría decir que bajo condiciones de elevados niveles de AA libre (ej. inflamación), la FLAP podría tener menor importancia para la formación de LTs lo que explicaría la menor eficacia de sus inhibidores.

Es importante destacar que los inhibidores de la FLAP pueden afectar a otras funciones celulares independientemente de su unión a la FLAP y del bloqueo de la síntesis de LTs. Entre estos efectos se ha encontrado que pueden inhibir la cadena respiratoria en neutrófilos (340,345) y la actividad de la LTC₄ sintasa (72). Ya que los ácidos grasos poliinsaturados en *cis* pueden modular muchas vías de señalización celular como fosfolipasas, proteínas quinasas, proteínas G, canales iónicos,... (346), no sería extraño que los inhibidores de la FLAP pudieran competir con estas moléculas por su lugar de unión y afectar así a otras funciones celulares.

4. Estudios con ratones modificados genéticamente (ratones *knockout*)

El desarrollo de ratones deficientes en alguno de los genes que participan en la vía de la 5-LO ha ido en aumento durante la última década. Entre ellos se incluyen genes implicados en la biosíntesis de LTs como por ejemplo, la 5-LO, la LTA₄ hidrolasa y la LTC₄ sintasa, y genes implicados en el mecanismo de acción de estos eicosanoides como por ejemplo, los genes que codifican para los receptores del LTB₄ y de los cisteinil-LTs. La investigación con estos ratones constituye un gran avance para el mejor entendimiento de esta vía metabólica así como del papel fisiopatológico de los LTs. A continuación se resumen los resultados obtenidos hasta la fecha, enfocados en la biosíntesis y acción de los cisteinil-LTs.

4.1. Deficiencia del gen de la 5-LO

En el año 1994, dos grupos simultáneamente el grupo de Colin Funk y el grupo de Beberly Koller, generaron los ratones deficientes en la 5-LO utilizando la estrategia de disrupción génica por recombinación homóloga en células madre embrionarias (308,347). Estos ratones incapaces de sintetizar LTs se desarrollan en el útero sin anomalías aparentes y nacen, crecen y se reproducen sin problemas. También, las células deficientes en la 5-LO tienen en algunos aspectos, un comportamiento *in vitro* aparentemente normal. Por ejemplo, los mastocitos derivados de la médula ósea activados con ionóforo A23187 liberan los componentes de los gránulos en cantidades normales y además sintetizan prostaglandinas a niveles equivalentes a los liberados por las células de los ratones *wild-type*. Los macrófagos peritoneales de los ratones deficientes en este enzima también sintetizan niveles normales de prostaglandinas en respuesta a zimosán pero tienen una capacidad parcialmente disminuida para la fagocitosis si se les compara con los macrófagos peritoneales de los ratones *wild-type*. (308,348). Existen numerosos estudios que utilizan estos ratones deficientes para evaluar el papel fisiopatológico de los LTs y como ocurre en los estudios con *knockouts* no siempre los resultados confirman una hipótesis de trabajo. Los ratones deficientes en la 5-LO presentan menores signos de inflamación sólo en determinados modelos experimentales como el edema en la oreja causado por AA, la peritonitis inducida por glicógeno o zimosán, el shock inducido por el PAF o el asma inducido por ovalbúmina (para una revisión exhaustiva consultar la Ref. (349)). No parece que los LTs jueguen un papel importante en el shock endotóxico causado por la endotoxina o en el edema en la oreja causado por ésteres de forbol, en su lugar sería más importante la acción de las prostaglandinas (308). En la peritonitis inducida por zimosán y gracias a la utilización de ratones *knockout* para el gen de la LTC₄ sintasa se ha corroborado que el LTB₄ es el responsable del reclutamiento de neutrófilos mientras

que los cisteinil-LTs están mayormente implicados en los cambios de la permeabilidad vascular peritoneal (350). El papel de la vía de la 5-LO como importante sistema de defensa contra patógenos extraños también ha sido analizado en los ratones deficientes en la 5-LO. En los primeros estudios en los que se infectó a estos ratones con *S. mansoni*, *L. monocytogenes* y *N. brasiliensis* no existieron claras evidencias de un fuerte papel de esta vía en la defensa humoral (351,352). Sin embargo, en la infección pulmonar causada por *Klebsiella pneumoniae* la vía de la 5-LO sí que parece ser relevante. De hecho, el LTB₄ juega un papel clave en el aumento de la actividad fagocitaria bacteriana de los neutrófilos mediada tanto por los receptores Fc como por el receptor del complemento (353,354).

Es importante destacar que en el ratón, los metabolitos derivados de la 5-LO participan activamente en la patogénesis de la fibrosis pulmonar causada por la bleomicina (comentario en el punto 4.2.5) (266). Este modelo experimental reproduce las características de un grupo de enfermedades pulmonares de diversa etiología que cursan con el desarrollo de fibrosis pulmonar. Después de la administración de bleomicina, los ratones deficientes en la 5-LO presentan histológicamente menores niveles de colágeno y una disminución significativa de los niveles de hidroxiprolina en pulmón así como menor número de células inflamatorias. El mecanismo exacto del efecto protector a la bleomicina en ausencia de LTs se desconoce pero en este trabajo se sugiere que tanto es causa de un efecto directo de la ausencia de LTs como de un efecto indirecto mediante el cual se modula la síntesis de otros factores antiinflamatorios y antifibróticos. Así, en este estudio se demuestra que los leucocitos pulmonares de los ratones *knockout* producen mayores cantidades de interferón γ y que los niveles de PGE₂ en los lavados pulmonares de estos ratones también están aumentados (266).

Por otro lado, también se ha descrito que la 5-LO es el principal gen implicado en el desarrollo de lesiones arterioscleróticas en el ratón. La desaparición de sólo una copia

del gen de la 5-LO en ratones deficientes en el receptor de LDL es la responsable de una disminución del 95% en el área lesionada, a pesar de que los niveles de colesterol son muy similares entre los ratones con las dos copias de la 5-LO y los ratones con tan sólo una copia (355). Recientemente, el mismo grupo ha publicado un estudio realizado en humanos que apoya la tesis de la importancia de la 5-LO en la arteriosclerosis. Aunque no es muy exhaustivo, describe la existencia de variantes alélicas en el promotor de la 5-LO (a nivel del lugar de unión de Sp1) que se asocian a un mayor grado de arteriosclerosis (356).

En los modelos experimentales de isquemia/reperfusión intestinal y de pancreatitis aguda en los que la inflamación y el daño celular son causados principalmente por neutrófilos, la deficiencia en el gen de la 5-LO hace a estos ratones más resistentes al daño inflamatorio lo que hace sugerir un papel proinflamatorio importante de los metabolitos de la 5-LO en estos sistemas (357,358). Por otro lado, y en un modelo de transplante renal en ratón donde los estudios farmacológicos indicaban que los LTs participaban en el rechazo del transplante, los resultados obtenidos con los ratones *knockout* para la 5-LO indicaron lo contrario. Así, en los ratones deficientes en el gen de la 5-LO se acelera el rechazo por lo que los autores concluyen que en este modelo, los metabolitos de la 5-LO serían necesarios para incrementar la supervivencia del transplante (359).

4.2. Deficiencia del gen de la FLAP

Como se ha comentado anteriormente, la FLAP actúa como proteína accesoria para facilitar la transferencia del AA a la 5-LO (41). Los estudios *in vitro* sugieren que la FLAP es imprescindible para la síntesis de LTs, y el desarrollo de los ratones deficientes en esta proteína así lo confirman (82). De hecho, el fenotipo de estos ratones parece mimetizar el de los ratones deficientes en la 5-LO. Así, la FLAP parece ser importante en algunos modelos inflamatorios como es la inflamación inducida por AA o PAF así como en el

edema causado por la peritonitis provocada por zimosán. Sin embargo, en la anafilaxis pasiva causada por IgE o en la hipersensibilidad de tipo retardado no existen diferencias significativas entre los ratones deficientes y los ratones *wild type*. Además, los datos aportados en este estudio confirman que en la respuesta inflamatoria, la FLAP no tiene otras funciones adicionales diferentes a las de su papel en la síntesis de LTs (82). En el modelo experimental de artritis reumatoide en el ratón, la deficiencia en la FLAP reduce substancialmente la severidad de la artritis inducida por el colágeno. Se reduce la infiltración leucocitaria en el tejido conectivo sinovial así como la extravasación de plasma a la cavidad sinovial. También disminuye la destrucción de cartílago en comparación con la inflamación y destrucción observadas en las articulaciones del ratón *wild type* (360). Es importante destacar los resultados de un reciente trabajo publicado en la revista *Nature Genetics* en el cual se describe (y del mismo modo que ocurre con la 5-LO ver Ref. (356)), que la presencia de determinadas variantes alélicas a lo largo del gen de la FLAP está asociada a un mayor riesgo de sufrir un infarto de miocardio en una población muy definida de Islandia (361).

4.3. Deficiencia del gen de la LTA₄ hidrolasa

La LTA₄ hidrolasa es una enzima bifuncional ubicua que además de catalizar la transformación del epóxido inestable LTA₄ a LTB₄ también posee actividad aminopeptidasa (362,363). Los ratones deficientes en esta enzima se desarrollaron en 1999 (364) y hasta la fecha sólo existe este estudio en el que se compara la contribución de los cisteinil-LTs versus LTB₄ en las reacciones inflamatorias agudas. Durante la peritonitis inducida por zimosán no se producen niveles detectables de LTB₄ y sí la producción de LTC₄ que incluso se ve aumentada. En el modelo de inflamación inducido por AA, la reducción en el número de neutrófilos reclutados en los ratones deficientes en la LTA₄

hidrolasa es muy similar a la respuesta observada en los ratones deficientes en la 5-LO por lo que el LTB₄ sería el que contribuye a la respuesta inflamatoria celular. Por lo que respecta a la respuesta vascular es decir, a la formación de edema y extravasación de plasma no sólo están implicados los cisteinil-LTs sino también el LTB₄. En otro modelo inflamatorio como es el shock inducido por PAF, el LTB₄ parece ser el principal responsable de los implicado en esta patología. En este trabajo además, los autores no identificaron ningún papel *in vivo* para la actividad aminopeptidasa de la LTA₄ hidrolasa (364).

4.4. Deficiencia del gen de la LTC₄ sintasa

La LTC₄ sintasa es una proteína de membrana con actividad glutatión *S*-transferasa que tiene al LTA₄ como único substrato (365). Pertenece a una superfamilia de proteínas de membrana implicadas en el metabolismo de los eicosanoides y del glutatión dentro de las cuales también se incluye la FLAP y las glutatión *S*-transferasas microsomales (MGSTs) (366). Los ratones deficientes en esta enzima tienen un desarrollo normal y son fértiles (350). La síntesis de LTC₄ se reduce más de un 90% en pulmón, estómago y colon. *In vitro*, y después de la estimulación con IgE, los mastocitos derivados de la médula ósea de estos ratones no producen niveles detectables de LTC₄ pero sí niveles de PGD₂, LTB₄ y 5-HETE muy similares a los de los ratones *wild-type*. En cambio, en estas condiciones y con respecto a los *wild-type* sí que se observa que los mastocitos de los ratones deficientes producen mayores cantidades de 6-*trans* LTB₄, producto de la degradación del LTA₄. La extravasación de proteína plasmática a la cavidad intraperitoneal inducida por zimosán o la anafilaxis retardada causada por la IgE se encuentran significativamente reducidas en los ratones deficientes en la LTC₄ sintasa. Los resultados de este primer estudio con estos ratones indican que la LTC₄ sintasa y no otras MGSTs es la principal responsable del

incremento en la permeabilidad vascular que tiene lugar en las respuestas inflamatorias innatas o adaptativas (350). De nuevo comentar aquí el trabajo publicado por Beller y colaboradores en el que se observa que los ratones que carecen de LTC₄ sintasa y por lo tanto, no producen cisteinil-LTs, están protegidos de la respuesta inflamatoria y fibrogénica producida por la bleomicina (267).

4.5. Deficiencia del gen de la γ -glutamil transpeptidasa (GGT) y γ -glutamil leucotrienasa (GGL)

La GGT se caracterizó *in vitro* como la enzima que cataliza la conversión del LTC₄ a LTD₄ mediante la escisión del residuo γ -glutamil situado en la posición C-6 del LTC₄ (28). Durante la caracterización del ratón deficiente en GGT se observó que aún continuaba produciéndose LTD₄ a partir de LTC₄ en muchos tejidos como el bazo, el intestino delgado, y el riñón. Además, los ratones deficientes en GGT presentaban glutathionemia y glutathionuria y morían muy prematuramente (367). Así, este fenotipo no estaba relacionado con la conversión de LTs sino con una alteración en la homeostasis de la cisteína y del glutatió n reducido. No fue hasta 1998 que se descubrió otra actividad enzimática de la familia de las GGT capaz de transformar el LTC₄ a LTD₄, a esta enzima se le denominó γ -glutamil leucotrienasa (GGL) (368) y parece ser la responsable de la formación de LTD₄ *in vivo* (369). De hecho, los estudios con los ratones *knockout* indican que aunque sólo las actividades GGT y GGL son las responsables de la transformación del LTC₄ a LTD₄, la ausencia de GGL ya es suficiente para disminuir la producción de LTD₄ durante la inflamación peritoneal en el ratón resultando además en una atenuación de la respuesta inflamatoria aguda (370).

4.6. Deficiencia del gen de la dipeptidasa ligada a membrana (MBD)

La MBD cataliza la transformación del LTD₄ a LTE₄ mediante la eliminación de un residuo de glicina del dipéptido cisteinil-glicina situado a nivel del C-6 del LTD₄. Los ratones deficientes en la MBD son viables y fértiles, y de ellos se esperaba que tuviesen un incremento en la respuesta anafiláctica ya que el LTD₄ es mucho más potente que el LTE₄. Esto aún no se ha podido comprobar porque estos ratones continúan siendo capaces de formar LTE₄ de forma que dependiendo del tejido estudiado, se observa una producción de este eicosanoide que oscila entre el 16 y el 90% (371). De hecho, recientemente se han caracterizado en el ratón dos proteínas adicionales pertenecientes a la familia de MBD, la MBD-2 y la MBD-3, de elevada homología aminoacídica con determinadas secuencias de cDNA humanas (372). La expresión de estas proteínas difiere entre tejidos si bien tanto la MBD-1 como la MBD-2 se encuentran en el pulmón y parecen ser las responsables de la eliminación de LTD₄ en este tejido. También existen entre ellas diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato. Así, la MBD-3 hidroliza preferentemente otros sustratos diferentes del LTD₄ que también presentan el dipéptido cisteína-glicina (372).

4.7. Deficiencia en el gen del receptor de cisteinil-LTs, Cys-LT₁

La producción de los ratones deficientes en el receptor Cys-LT₁ es muy reciente (300) de hecho, este receptor murino fue caracterizado tan sólo un año antes por varios grupos casi simultáneamente (373-375). En el primer trabajo con estos ratones *knockout*, se examinó la extravasación plasmática y la infiltración de neutrófilos en la inflamación peritoneal inducida por zimosán y la extravasación plasmática en el modelo de anafilaxis pasiva cutánea mediada por la IgE (300). Mientras que los macrófagos peritoneales de los ratones *wildtype* presentan los receptores Cys-LT₁ y Cys-LT₂ y responden más al LTD₄

que al LTC₄ (1μM), los ratones deficientes en el receptor Cys-LT₁ no responden a ninguno de estos dos LTs. La extravasación plasmática se ve significativamente disminuida tanto en el modelo de inflamación peritoneal por zimosán como en el de anafilaxis pasiva, sin embargo, no existen diferencias en cuanto a la infiltración de neutrófilos entre los ratones *wildtype* y los *knockout*. Estos resultados son prácticamente idénticos a los obtenidos con los ratones deficientes en la LTC₄ sintasa (350) en los que sí se sintetiza LTB₄ responsable de este efecto quimiotáctico. La caracterización del receptor Cys-LT₂ en ratón es aún más cercana (376,377) por lo que aún no existen estudios con *knockouts* para este receptor. Sí que ha aparecido recientemente un trabajo que utiliza ratones deficientes en el receptor Cys-LT₁ y ratones deficientes en la LTC₄ sintasa para tratar de averiguar cuál es el posible papel de los receptores Cys-LT₁ y Cys-LT₂ durante la inflamación y fibrosis pulmonar inducida por la bleomicina (267). En los ratones deficientes en la LTC₄ sintasa (no producen cisteinil-LTs), la inflamación y fibrosis tisular se encuentran significativamente reducidas mientras que en los ratones *knockout* para el receptor Cys-LT₁ estos procesos de remodelado tisular se agravan. Estos resultados además de corroborar el papel de los cisteinil-LTs como mediadores de inflamación profibrogénicos, indican que el receptor Cys-LT₁ no es el que media las señales para el desarrollo de fibrosis pulmonar y apuntan a que el receptor responsable del efecto profibrótico de los cisteinil-LTs en el pulmón es el receptor Cys-LT₂ (267).

5. Nuevas implicaciones de la 5-LO

5.1. Proliferación celular y cáncer

Inhibición de la 5-LO y apoptosis

Estudios recientes demuestran que la 5-LO juega un papel clave en la proliferación y supervivencia celular (378). En este sentido, la inhibición de la actividad 5-LO es capaz de

bloquear el crecimiento celular o bien inducir apoptosis en diferentes tipos celulares como neuronas, mastocitos, células mesoteliales y endoteliales (26,279,379-381) y en algunos tipos de células cancerígenas de pulmón, próstata, páncreas, colon y mama. En estos y otros estudios se han utilizado una gran variedad de inhibidores de la actividad 5-LO para estudiar el efecto de esta enzima sobre la proliferación celular incluyendo los compuestos: MK-886, AA-861, NDGA, A-79175, BW-755c, BW-A4C, BW-B70C, zuletón, A-63162, SC-41661A, ICI-230487, cirsiolol, L-651392 y L-651896 (para una revisión exhaustiva consultar Ref. (382)). Entre ellos, el MK-886 es el único que induce apoptosis independientemente de la inhibición de la actividad 5-LO ya que es capaz de inducir la muerte celular en células que no expresan la 5-LO ni otras LOs (383-385).

Poco se conoce hasta la fecha sobre los mecanismos por los cuales la inhibición de la 5-LO induce apoptosis. Como se extenderá más adelante, alguno de sus metabolitos como el 5-HETE, son capaces de revertir la apoptosis inducida por los inhibidores específicos de la 5-LO en células humanas de cáncer de próstata (386) lo que sugiere que estos metabolitos son necesarios para el crecimiento celular. Sin embargo, también se ha postulado que este efecto sea debido a otros factores como son la acumulación intracelular de AA libre (387), la interacción directa de la 5-LO con proteínas relacionadas con la señalización intracelular y la organización del citoesqueleto (122,132), el VEGF (379) o la *up-regulation* de los PPARs α y γ (388). En el caso de la apoptosis no dependiente de 5-LO inducida por el MK-886 y dada la semejanza estructural de este compuesto con un ácido graso se ha postulado que éste puede interactuar con otras moléculas como por ejemplo los PPARs. Estos receptores una vez activados se transforman en factores de transcripción y pueden activar la transcripción de muchos genes, entre ellos genes implicados en el crecimiento celular (389). De hecho recientemente se ha observado que el MK-886 inhibe

eficientemente al PPAR α aunque se desconoce qué gen o genes se encuentran afectados por este bloqueo de la actividad del PPAR α (390).

Eicosanoides derivados de la 5-LO y proliferación celular

Hasta la fecha se desconocen con exactitud los mecanismos implicados en el efecto de la 5-LO sobre el crecimiento celular. Existen estudios que demuestran el efecto proliferativo de algunos metabolitos de la vía de la 5-LO como son el 5-HETE, los cisteinil-LTs y en menor proporción el LTB₄. El 5-HETE por ejemplo, estimula la proliferación celular de diferentes líneas celulares cancerígenas y es capaz de revertir el efecto antiproliferativo de la inhibición de la 5-LO (178,181,379,386,391). En cuanto a la vía de señalización intracelular del 5-HETE, se ha observado que en el adenocarcinoma de próstata, la estimulación del crecimiento producida por este compuesto parece estar mediada por un receptor de membrana ligado a proteínas G que aún no ha sido clonado (181). También se ha determinado recientemente que el 5-HETE estimula el crecimiento de células microvasculares endoteliales humanas (HMVEC) a través de la inducción de la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos básico 2 (bFGF-2) y que este efecto se debe a la activación coordinada de las vías señalización PI3-quinasa/Akt y Jak/STAT (26).

De entre los cisteinil-LTs, el LTD₄ es el principalmente involucrado en el crecimiento de distintos tipos celulares. Por ejemplo, en presencia de determinadas citoquinas es capaz de incrementar el crecimiento de células progenitoras hematopoiéticas a través de su acción sobre el receptor Cys-LT₁ (392). La activación de este receptor por el LTD₄ también se asocia a un incremento en la proliferación de células epiteliales intestinales (258,393), células musculares lisas vasculares (259,394), células epiteliales glomerulares (395) y células mesangiales renales (396). En el caso de éstas últimas, se ha descrito que la inducción de la proliferación requiere de la activación tanto de la quinasa regulada por

señales extracelulares erk como de la activación de la PI3-quinasa (396) así como de la transactivación del receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRbeta) (397). Sin embargo, el efecto antiapoptótico del LTD₄ sobre las células epiteliales intestinales parece estar mediado por una disminución de la activación de la caspasa 8 así como de la generación de la forma activa de la proteína proapoptótica Bid (398). El LTC₄ es un potente mitógeno para células epiteliales glomerulares (257) y células endoteliales de aorta (256). También es importante destacar que los cisteinil-LTs pueden modular la proliferación de fibroblastos humanos procedentes de la piel (255). Tanto el LTC₄ como el LTB₄ ejercen un potente efecto estimulador y sinérgico sobre la proliferación inducida por el GM-CSF en células progenitoras mieloides humanas (399). Se ha encontrado que el LTB₄ potencia la proliferación en linfocitos T y B inducida por la IL-2 y la IL-4, respectivamente (400,401) y que es capaz de revertir la apoptosis constitutiva de los PMN humanos (402).

5.2. Osteoporosis

Aunque no existen muchos estudios sobre el papel de los metabolitos de la 5-LO en el metabolismo del hueso, los datos existentes hasta la fecha indican una función diferente a la de las PGs. Las PGs de la serie E estimulan la reabsorción de hueso *in vitro* (403) y la formación de hueso tanto *in vitro* como *in vivo* (404). Sin embargo, los metabolitos de la 5-LO parecen ser reguladores negativos de la formación de hueso. El 5-HETE y los cisteinil-LTs estimulan la formación y actividad de los osteoclastos *in vitro* (405) y esta actividad inducida por los LTs se asocia con una mayor reabsorción de hueso tanto *in vivo* como *in vitro* (406,407). De hecho *in vitro*, se ha demostrado que el 5-HETE y en menor medida el LTB₄ son potentes inhibidores de la formación de hueso en un modelo experimental de osteoblastos fetales de rata (408). Se especula que estos metabolitos podrían disminuir la

función osteoblástica o la formación de hueso en condiciones patológicas donde existe una elevada producción de estos eicosanoides. Tal es el caso de la artritis reumatoide, de hecho, los pacientes con esta enfermedad que no han recibido un tratamiento con glucocorticoides tienen una tasa de formación ósea significativamente inferior a la observada en los sujetos sanos (409).

5.3. Arterioesclerosis

Los mecanismos implicados en la inflamación y aterogénesis de la pared arterial son motivo de multitud de trabajos de investigación. Entre ellos están los estudios sobre la hipótesis de la oxidación lipídica que tiene a las LDLs oxidadas como responsables de un mayor daño arterial y de la formación de células espumosas (410,411). De entre las distintas LOs, la 15-LO es la que inicialmente se ha observado capaz de oxidar a la LDL (412) aunque los estudios en la arteriosclerosis en humanos son limitados. La implicación de la vía de la 5-LO en el proceso arteriosclerótico no ha recibido mucha atención hasta hace pocos años. De hecho en ratones susceptibles a padecer arteriosclerosis se ha definido al gen de la 5-LO como el principal responsable de esta susceptibilidad (355,413). Con el objetivo de establecer qué relación existe entre la vía de la 5-LO y la arteriosclerosis en humanos Spanbroek y colaboradores estudiaron la expresión de los genes implicados en la cascada de la 5-LO en las arterias coronarias y carótida así como en la aorta (414). Los resultados de este estudio indicaron que la 5-LO se encuentra de forma abundante a nivel de monocitos/macrófagos, células dendríticas, mastocitos y granulocitos neutrofilicos y que además el número de células positivas para la 5-LO aumenta en las lesiones arteriales avanzadas. Por el contrario, la expresión de la 15-LO tanto en las arterias de los sujetos sanos como de los pacientes con arteriosclerosis fue muy baja comparada con la expresión de la 5-LO y además no se asociaba con la patología (414). Los autores concluyeron que

en la arteriosclerosis, la 5-LO podría estar implicada principalmente en los estadios más avanzados de la enfermedad y no descartaron un papel activo de la 15-LO en estadios previos sólo a nivel de determinados tipos celulares monocíticos. En un estudio mucho más reciente realizado en humanos y ya comentado anteriormente, se describen diferentes variantes genotípicas para el promotor de la 5-LO asociadas a un incremento en la arteriosclerosis. Además, el análisis estadístico de la relación existente entre la dieta y la presencia de estas variantes polimórficas sugiere que mientras los ácidos poliinsaturados en n-6 promueven la inflamación asociada a la arteriosclerosis, la ingesta de ácidos poliinsaturados en n-3 la atenúa (356).

IV. Enfermedad hepática crónica.

1. Aspectos generales. Eicosanoides y enfermedad hepática

La cirrosis hepática es una de las enfermedades del hígado con más prevalencia e incidencia en nuestro país. En Estados Unidos, donde existen datos concretos de incidencia, se producen aproximadamente 30.000 defunciones al año por esta enfermedad a las que hay que sumar 10.000 muertes más por cáncer hepático derivado en la mayoría de casos, de una cirrosis establecida (415). Las causas de la cirrosis son múltiples e incluyen desórdenes congénitos, metabólicos, inflamatorios y tóxicos. Así, entre las causas más conocidas encontramos el consumo crónico de alcohol, la hepatitis crónica vírica (B o C), la cirrosis biliar primaria, la hepatitis autoinmune, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson, la colangitis esclerosante, el déficit de α -1-antitripsina y el consumo de fármacos hepatotóxicos.

La cirrosis hepática es en realidad, el estadio final de una hepatopatía crónica y se caracteriza histológicamente por la presencia de una importante alteración de la arquitectura tisular por fibrosis con la aparición de nódulos de regeneración y contracción del órgano. Una de las dificultades que se plantean a la hora del diagnóstico y el tratamiento de la cirrosis es el hecho de que esta enfermedad puede ser clínicamente latente y asintomática. Puede ser descubierta fortuitamente en la realización de un examen clínico o bien diagnosticada en pacientes que son explorados por síntomas inespecíficos como anorexia, astenia o adelgazamiento. Es en estos casos, cuando la enfermedad no presenta complicaciones graves, cuando se le denomina cirrosis compensada. La posibilidad de que aparezca alguna de las complicaciones de la cirrosis hepática, ascitis, hemorragia digestiva o encefalopatía, aumenta en relación a la duración de la enfermedad y a la aparición de los trastornos hemodinámicos e insuficiencia hepática derivados tanto de la alteración vascular intrahepática así como de la reducción de la masa funcional hepática.

El tratamiento actual de la cirrosis pasa por eliminar el agente causante del daño hepático (en el caso de que esto sea posible) por ejemplo, la administración de interferón, ribavirina o lamivudina en la hepatitis vírica o bien el uso del transplante hepático. El transplante hepático es el único tratamiento curativo para la cirrosis muy avanzada y tiene un alto porcentaje de éxito ya que la tasa de supervivencia después de 5 años post-transplante es del 75% (416). Sin embargo, además de existir una limitada disponibilidad de órganos existen determinados factores que hacen que no todos los pacientes puedan ser transplantados. Es por ello necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos que resulten eficaces. Como se detallará más adelante (punto 3 de este capítulo), cada vez son más numerosas las evidencias de que el proceso fibrótico así como el estadio final de cirrosis

pueden revertirse por lo que actualmente existe un enorme esfuerzo científico por encontrar nuevas terapias antifibróticas realmente efectivas (415).

Una de las posibles dianas terapéuticas la constituye la vía biosintética de la 5-LO que como ya se ha especificado es la enzima clave responsable de la síntesis de 5-HETE y LTs, importantes mediadores lipídicos derivados del AA. Este grupo de eicosanoides incluye al LTB_4 implicado principalmente en la respuesta inflamatoria y los cisteinil-LTs que son potentes agentes vasoconstrictores capaces de incrementar la permeabilidad vascular y ejercer importantes funciones proliferativas y profibrogénicas. El hígado además de ser el principal órgano responsable de la degradación y eliminación de LTs, siendo la vía biliar frente a la renal la principal ruta de excreción de los compuestos de degradación (417), también es capaz de producir y liberar LTs de forma endógena por lo que estos eicosanoides se posicionan como potenciales mediadores del daño hepático (417,418). Las evidencias experimentales indican que de entre estos eicosanoides, los cisteinil-LTs son los que principalmente están involucrados en los procesos fisiopatológicos que tienen lugar en el hígado, especialmente a nivel de la hemodinámica intrahepática (417,418). Los estudios realizados con hígados aislados de rata sometidos a perfusión, demuestran que la administración de concentraciones nanomolar de LTC_4 o LTD_4 pueden producir una disminución del flujo de perfusión (en el caso de los sistemas de perfusión a presión constante) o un incremento de la presión portal (en el caso de la perfusión a flujo constante) y además inducir edema del tracto biliar y colestasis (417,419-421). Los estudios clínicos también establecen una asociación entre los cisteinil-LTs y la enfermedad hepática. De hecho, la excreción urinaria de LTE_4 se encuentra incrementada en pacientes cirróticos con o sin acitosis, en la colestasis intrahepática, en la ictericia obstructiva, en el síndrome hepatorenal y en la intoxicación aguda por alcohol (422-425). Durante los últimos años y dadas las propiedades vasoconstrictoras, proliferativas y profibrogénicas de

los cisteinil-LTs, ha habido un interés creciente por estudiar la vía de síntesis de estos eicosanoides en el hígado y el posible papel fisiopatológico de estos compuestos en la enfermedad hepática. Entre los estudios publicados en los últimos años sobre cisteinil-LTs y enfermedad hepática se encuentran los trabajos realizados para esta tesis doctoral y todos ellos serán comentados en el apartado de discusión (para una revisión exhaustiva consultar Ref. (426)).

2. Alteraciones intrahepáticas

Cuando la cirrosis es muy severa y se produce la completa desestructuración del parénquima hepático aparece insuficiencia hepática y trastornos hemodinámicos graves. Una de las primeras complicaciones hemodinámicas es la aparición de hipertensión portal que tiene lugar como consecuencia de un incremento en la resistencia intrahepática así como de un aumento intrínseco del tono vascular de la microvasculatura hepática. Como se ha comentado anteriormente, la perpetuación de estas anomalías intrahepáticas acaban por dar lugar a la aparición del síndrome de circulación hiperdinámica, ascitis y encefalopatía hepática.

2.1. Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es la acumulación de tejido conectivo en el hígado como consecuencia de un desequilibrio entre la producción y la degradación de proteínas de matriz extracelular (427). Como se extenderá más adelante, podemos decir que la línea de acontecimientos que desencadenan la fibrosis hepática se inicia con la aparición de una respuesta inflamatoria. En condiciones normales mediante la respuesta inflamatoria se consigue eliminar el agente causante del daño hepático. Sin embargo, en determinadas

circunstancias, especialmente si el daño se produce de forma crónica y continuada, la respuesta inflamatoria no se resuelve de forma adecuada y se auto-perpetúa en el tiempo, dando lugar a procesos de secreción inadecuada de matriz extracelular y a la aparición de fibrosis (428). Existen numerosos datos experimentales que apoyan la hipótesis de que las células hepáticas estrelladas (HSCs) son las principales mediadoras del daño tisular en esta última etapa del proceso fibrótico (427). Estas células en un hígado normal se distinguen principalmente por almacenar ácido retinoico. Sin embargo, bajo determinados estímulos inflamatorios las HSCs se activan y se transforman en células tipo miofibroblasto, expresan proteínas contráctiles como la α -actina del músculo liso, son capaces de proliferar y producen los colágenos fibrilares presentes en el hígado cirrótico. Además, las HSCs activadas son capaces de contraerse en respuesta a determinados factores vasoactivos como la endotelina y debido a su estratégica localización en el espacio de Disse, sobre las células endoteliales sinusoidales (ver punto 3 de este capítulo) contribuyen al incremento en la resistencia sinusoidal intrahepática y por lo tanto al desarrollo de hipertensión portal (429).

Existe un gran esfuerzo científico centrado en las HSCs como diana terapéutica. Sin embargo, son menos los estudios centrados en la primera etapa de la fibrosis, cuando el proceso inflamatorio tiene lugar y las células de Kupffer se posicionan como las principales efectoras del daño hepático. Se ha demostrado que las células de Kupffer, mediante la liberación de eicosanoides junto con citoquinas y factores de crecimiento, desempeñan un papel primordial en la activación y proliferación de las HSCs (430-432). En este sentido se ha descrito que el medio condicionado procedente de cultivos de células de Kupffer promueve la proliferación de las HSCs y la síntesis de colágeno, proteoglicanos e hialuronato (430-434), efecto que es más acentuado si las células de Kupffer se han aislado de hígados de ratas tratadas con CCl_4 (433,434). Se han identificado numerosos

compuestos liberados por las células de Kupffer que pueden ejercer este efecto proliferativo y estimulador de las HSCs, y entre ellos destacan los eicosanoides, TGF β , PDGF, TNF α , IL-1 e IFN γ (para una revisión exhaustiva consultar Ref. (415)).

2.2. Hipertensión portal

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente de la cirrosis descompensada, presentándose en más del 80% de estos pacientes. Su principal consecuencia es la formación de vasos colaterales que derivan la sangre portal a la circulación sistémica evitando el paso a través del hígado. Estos vasos portosistémicos pueden derivar en varices esofágicas que tienen un riesgo muy elevado de sangrado masivo, complicación muy grave de la hipertensión portal con una mortalidad media en el primer episodio hemorrágico del 37% (435,436).

En un hígado normal y en respuesta a un incremento en el flujo sanguíneo, se produce la distensión del árbol intrahepático vascular disminuyendo así la resistencia intrahepática. Este es un mecanismo compensador que mantiene el gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava dentro de los límites normales (entre 1 y 5 mmHg). Este fenómeno no ocurre en la cirrosis ya que los cambios morfológicos que tienen lugar en el hígado como la fibrosis, los nódulos de regeneración y la distorsión y obliteración estructural de los vasos sanguíneos incrementan la resistencia intrahepática al paso del flujo sanguíneo portal elevando el gradiente de presión de manera significativa. Cuando estos valores son iguales o superiores a 12 mmHg pueden aparecer complicaciones derivadas de la hipertensión portal por esto se le considera como valor indicativo de hipertensión portal clínicamente evidente (435,436).

En el desarrollo de la resistencia intrahepática no sólo juega un papel fundamental la distorsión estructural asociada al daño hepático sino también el aumento intrínseco del tono

vascular de la microvasculatura intrahepática que tiene lugar durante el proceso cirrótico (437). Existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que los sinusoides hepáticos son capaces de contraerse y relajarse en respuesta a diferentes agentes vasoactivos (438). Además, la disminución en el calibre luminal de los sinusoides se colocaliza con los lugares de mayor presencia de células hepáticas estrelladas (HSC) (439). Como se ha comentado previamente y se extenderá después, estas células se localizan en el sinusoides hepático, emitiendo prolongaciones que rodean las células endoteliales sinusoidales. Las HSC pueden activarse y manifestar propiedades contráctiles provocando así una disminución del calibre sinusoidal. Por esto, tanto el estadio de activación de estas células como la presencia de agentes vasoactivos en la microcirculación hepática pueden contribuir al desarrollo de resistencia intrahepática (429,440).

En la hipertensión portal crónica se desencadena un mecanismo de homeostasis circulatoria que da lugar al denominado síndrome de circulación hiperdinámica. El cuadro clínico de esta disfunción circulatoria viene determinado por una disminución de las resistencias vasculares sistémicas, hipotensión, un incremento del volumen plasmático y del gasto cardíaco (441). Estas alteraciones son consecuencia de la severa vasodilatación de la circulación arterial esplácnica que tiene lugar cuando la hipertensión portal persiste en el tiempo (435). La primera consecuencia de esta vasodilatación local del área esplácnica es una vasodilatación arterial sistémica ya que el volumen sanguíneo no es capaz de llenar el árbol vascular. Durante la primera etapa de esta disfunción circulatoria, cuando aún no ha aparecido ascitis, y para mantener la presión arterial dentro de los límites normales, tiene lugar la retención renal de sodio y agua lo que produce un incremento del volumen sanguíneo y del gasto cardíaco. Sin embargo, en fases más avanzadas de la enfermedad cuando la vasodilatación esplácnica es muy severa, este mecanismo compensador deja de ser suficiente para mantener la homeostasis circulatoria. La presión

arterial disminuye causando una disminución del volumen sanguíneo central (corazón, pulmón y aorta). Es entonces cuando se activan los baroreceptores arteriales y cardiopulmonares desencadenando una respuesta neurohormonal con la activación del sistema nervioso simpático y de los sistemas renina-angiotensina-aldosterona y arginina-vasopresina. La activación endógena de estos sistemas vasoconstrictores no mejora los trastornos hemodinámicos pues agravan la retención de sodio y agua por el riñón lo que conlleva a la aparición de ascitis.

La ascitis se define como la acumulación de líquido en la cavidad intraperitoneal y aparece tarde, cuando existe una hipertensión portal severa e insuficiencia hepática. En un 50% de los pacientes diagnosticados de cirrosis hepática se desarrollará la formación de ascitis en el plazo de 10 años. Es por esto, una de las complicaciones más frecuentes de la cirrosis y su aparición modifica desfavorablemente el pronóstico de estos pacientes. La probabilidad de supervivencia después de dos años de ser diagnosticada es del 40% pero el pronóstico es mucho peor en los casos de ascitis refractaria y peritonitis bacteriana espontánea (442).

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos de la formación de ascitis, actualmente la hipótesis de la vasodilatación arterial periférica se configura como la más aceptada. Según esta hipótesis se considera que la acumulación de líquido en la cavidad abdominal viene determinada en primer lugar, por la severa vasodilatación arterial esplácnica que causa simultáneamente tanto la retención renal de sodio y agua como una disfunción de la microcirculación esplácnica. El volumen arterial efectivo no puede mantenerse a expensas de incrementar el volumen plasmático, el sistema linfático se vuelve incapaz de drenar el exceso de líquido intersticial retenido en la cavidad esplácnica y éste finalmente se extravasa a la cavidad abdominal (443).

2.3. Patogénesis: inflamación y fibrosis

Como ya se ha comentado anteriormente, la cirrosis hepática es el estadio final de muchas enfermedades crónicas del hígado siendo la consecuencia de un proceso inflamatorio y de reparación de tejido que tiene lugar en respuesta a una continua agresión externa. De forma muy resumida se puede decir que la línea de acontecimientos que se desencadena en respuesta al daño hepatocelular comienza por una respuesta inflamatoria. La inflamación es la respuesta defensiva de los organismos vivos a la agresión de agentes externos, y comprende un amplio abanico de eventos como la activación enzimática, la liberación de mediadores solubles, la extravasación de fluidos, la adhesión y migración celular y la destrucción del tejido lesionado y su posterior reparación. Si el daño hepatocelular se perpetúa en el tiempo, la respuesta inflamatoria no se resuelve adecuadamente y se desencadenan procesos de remodelado tisular con la consecuente secreción inadecuada de matriz extracelular y la aparición de fibrosis. En fases más avanzadas aparece el cuadro histológico que define a la cirrosis con la pérdida completa de la arquitectura hepática. (ver *Figura 8*) (427).

El proceso inflamatorio incontrolado juega un papel clave en el desarrollo de fibrosis hepática (427) y además, las células de Kupffer, que forman la mayor población de macrófagos residentes en el cuerpo humano, se posicionan como una de las principales células inflamatorias efectoras iniciando la cascada inflamatoria que da lugar al remodelado tisular y la aparición de fibrosis (444-446). De hecho, las células de Kupffer participan de forma muy activa en el inicio y la progresión de la fibrosis hepática liberando factores solubles como citoquinas, especies reactivas derivadas del oxígeno, y eicosanoides (444-446). Como ya se ha comentado en el punto 2.1 de este capítulo, estos fenómenos

inflamatorios acaban por activar a las HSCs y en consecuencia se produce la síntesis inadecuada de colágeno, proteoglicanos y ácido hialurónico (445).

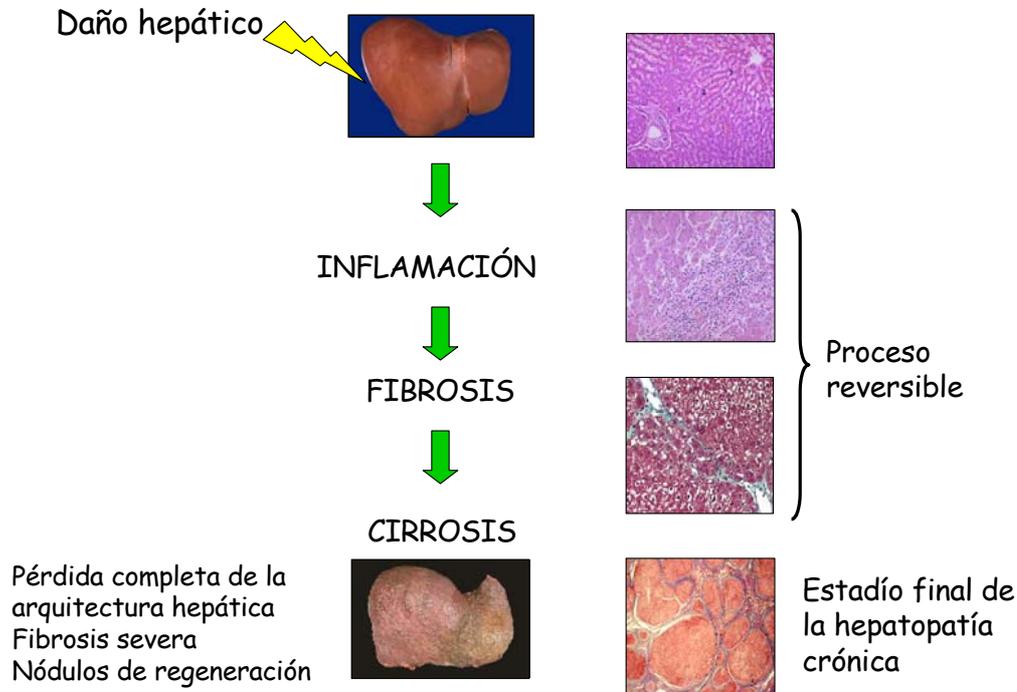


Figura 8. Patogénesis de la enfermedad hepática crónica. La línea de acontecimientos que se desencadena en respuesta al daño hepatocelular comienza con una respuesta inflamatoria cuyo objetivo es eliminar el agente causante del daño hepático. Si la lesión se perpetúa en el tiempo, la respuesta inflamatoria no se resuelve de forma adecuada y se desencadenan procesos de remodelado tisular con la consecuente secreción inadecuada de matriz extracelular y la aparición de fibrosis. En fases más avanzadas de la enfermedad aparece el cuadro histológico que define a la cirrosis con la completa desestructuración del parénquima hepático.

El estudio de los mecanismos involucrados en la perpetuación de la fibrosis y en consecuencia en la aparición de cirrosis ha adquirido mayor relevancia en los últimos años. Esto se debe a la existencia de numerosos estudios que evidencian que el proceso de fibrosis hepática es bidireccional y por lo tanto potencialmente reversible. Existen numerosos estudios realizados con modelos animales experimentales de daño hepático en los que se revierte con éxito la progresión de la fibrosis hepática con la eliminación o el

bloqueo del estímulo fibrogénico (447-455). Además y lo que es más significativo, en humanos también se ha observado la posibilidad de regresión no sólo en determinados pacientes con fibrosis sino también en algunos pacientes con cirrosis establecida (456-460).

Por todo esto, actualmente no sólo existe un gran interés por encontrar tratamientos alternativos antifibróticos efectivos que puedan prevenir o revertir el proceso fibrótico sino también por encontrar criterios diagnósticos menos agresivos que la caracterización de la biopsia hepática para poder realizar un diagnóstico precoz y eficaz de la enfermedad. Muchos de los ensayos actuales fracasan a la hora de detectar esta enfermedad hepática en sus etapas iniciales ya que la fibrosis y la cirrosis pueden ser asintomáticas durante décadas. Actualmente se está investigando para encontrar marcadores serológicos indicativos de deposición hepática anormal de proteínas de matriz extracelular. Entre los marcadores que se están estudiando se encuentran PIIINP, PICP, colágeno VI, tenascina, indulina, colágeno XIV, laminina P1, ácido hialurónico, TIMP-1, MMP-2 y colágeno IV (415).

3. El sinusoides hepático

Para comprender los mecanismos celulares que tienen lugar durante el proceso fibrótico es importante explicar previamente cuál es la organización básica del hígado, el sinusoides hepático.

El sinusoides hepático es la unidad estructural y funcional del hígado y constituye un sistema microvascular formado por diferentes tipos celulares altamente especializados (*Figura 9*).

Las células del sinusoides hepático se dividen en células parenquimales, los hepatocitos, que constituyen más del 80% del volumen hepático, y las células sinusoidales no-parenquimales (NPC) entre las que se encuentran las células de Kupffer, las HSCs también denominadas células de Ito, células perisinusoidales, lipocitos o células almacenadoras de grasa, las células endoteliales sinusoidales (SEC) y las células citotóxicas o *pit cells* (461).

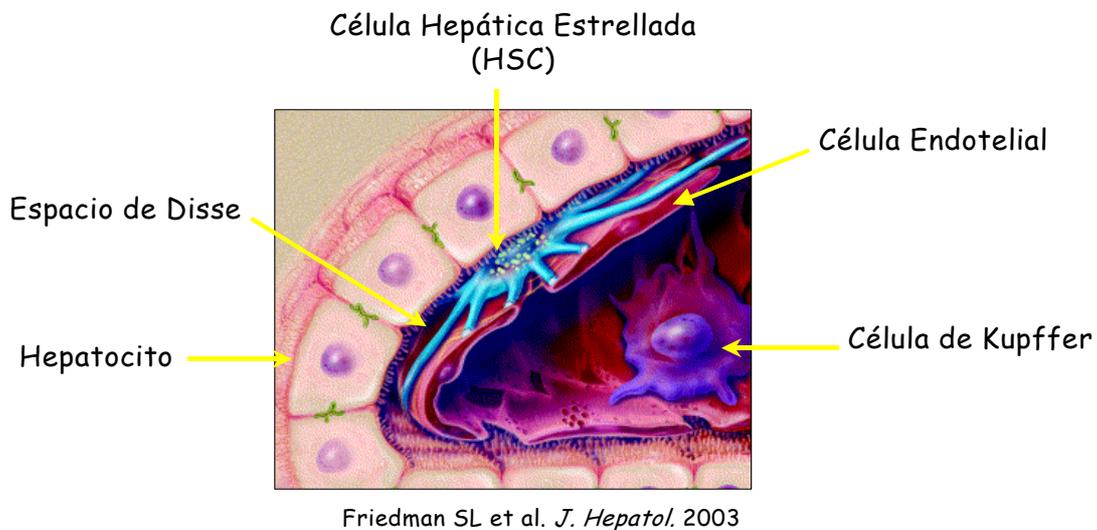


Figura 9. Células del sinusoides hepático. Las células que forman esta unidad funcional hepática son las células parenquimales o hepatocitos y las células no parenquimales entre las que se engloban las células hepáticas estrelladas, las células endoteliales sinusoidales y las células de Kupffer.

Las células de Kupffer representan el 29% del total de NPC y se localizan en el lumen sinusoidal sobre las células endoteliales emitiendo prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse subendotelial, de modo que les permite estar en contacto directo con los hepatocitos y las HSC. Las SEC constituyen el 48% del total de NPC y forman la pared fenestrada de los sinusoides, mientras que las HSC representan el 20% del total de NPC y se localizan en el espacio de Disse entre los hepatocitos y las células endoteliales. Por último, las *pit cells* que se localizan al igual que las células de Kupffer en el lumen sinusoidal (461), representan el 3% del total de NPC y son linfocitos granulares de gran

tamaño con actividad citotóxica caracterizadas como las células *natural killer* propias del hígado.

Ya que el segundo trabajo presentado en esta tesis se centra en el papel de las células de Kupffer durante la fibrogénesis centraré el resto del capítulo en las características de estas células y su implicación en el daño tisular hepático.

3.1. La célula de Kupffer

3.1.1. Características morfológicas

Las células de Kupffer se sitúan sobre las células endoteliales emitiendo prolongaciones citoplasmáticas al espacio de Disse subendotelial, de modo que les permite estar en contacto directo con los hepatocitos y las HSC. El estudio de la ultraestructura de estos macrófagos en el hígado de la rata muestra un contorno irregular pero de forma básicamente estrellada. La superficie celular presenta numerosos microvillis o lamelipodios e invaginaciones en forma de líneas onduladas que parecen estar implicadas en la endocitosis (462). El citoplasma es rico en diferentes vesículas intracitoplasmáticas, presenta mitocondrias, un aparato de Golgi extenso, abundante retículo endoplasmático rugoso, y un conjunto de diferentes estructuras vacuolares y cuerpos densos que varían en forma, diámetro y densidad y que constituyen el desarrollado aparato lisosomal de la célula de Kupffer (462). Como importantes componentes del citoesqueleto de estos macrófagos, encontramos un sistema muy activo de microfilamentos y microtúbulos de actina y miosina así como filamentos de vimentina, que permiten tanto el mantenimiento de la estructura celular como el movimiento de fagocitosis y migración celular (463,464).

La identificación de las células de Kupffer se lleva a cabo habitualmente utilizando la combinación de diferentes métodos que detectan características propias del macrófago. En el hígado de rata las técnicas más utilizadas son la localización celular de la actividad peroxidasa endógena junto con la detección de la actividad fagocitaria mediante partículas de látex, oro coloidal o carbón (465,466). La célula de Kupffer claramente se distingue de los monocitos circulantes al presentar la actividad peroxidasa localizada específicamente a nivel de retículo endoplasmático y membrana nuclear, mientras que en monocitos su expresión sólo es a nivel lisosomal (467). Sin embargo, tanto la positividad para la peroxidasa como la actividad fagocitaria son criterios que deben utilizarse con precaución por varios motivos. En primer lugar, la técnica de la peroxidasa es mucho más fiable y reproducible cuando se trata de preparaciones celulares o secciones de 1 µm de tejido incluido en resina. Además, en el hígado de rata y según el método de fijación utilizado, las SEC también pueden presentar actividad peroxidasa (468). Existen también diferencias entre especies pues en ratón se ha observado que un 60% de las SEC presentan actividad peroxidasa (469) y pueden incorporar partículas de látex (470,471). En humanos, existen estudios que indican tanto la ausencia como la presencia de actividad peroxidasa en las células de Kupffer (472,473).

La tinción de la actividad esterasa no-específica característica de los macrófagos en lugar de la peroxidasa endógena también es una técnica muy utilizada, pero necesariamente se ha de combinar con otros métodos para poder diferenciar a las células de Kupffer de macrófagos infiltrados en el hígado (474). Quizás el método más fiable, pero a su vez más costoso y laborioso, es la identificación inmunohistoquímica de las células de Kupffer mediante una batería de anticuerpos monoclonales específicos para estos macrófagos. En el hígado de la rata los anticuerpos más utilizados son el ED1 y el ED2. El

primero reconoce un antígeno de membrana lisosomal presente tanto en macrófagos residentes como en circulantes y el segundo reconoce un antígeno de membrana específico de las células de Kupffer (475).

Alternativamente, existen otros anticuerpos capaces de detectar proteínas de expresión específica en células de Kupffer en el hígado de la rata tales como el Ki-M2R (476), el UFT-4 (477), el Ku-1 (478) o el más recientemente caracterizado anti-KCA-3 (479). En ratón, los anticuerpos monoclonales F4/80 y BM8 son los más empleados (480,481). Para el estudio inmunohistoquímico de las células de Kupffer en humanos se utilizan anticuerpos contra proteínas características de las células del sistema mononuclear fagocítico. Se utilizan diferentes anticuerpos policlonales y monoclonales entre los que destacan los existentes contra la lisozima o la antitripsina α_1 y los anticuerpos KP1, Mac387, EBM11 y CD68 (482).

3.1.2. Características funcionales

En condiciones fisiológicas, las células de Kupffer eliminan de la circulación sanguínea todo tipo de partículas extrañas, innecesarias o alteradas mediante el proceso de fagocitosis. También participan en el metabolismo de las lipoproteínas (483) y juegan un papel clave en el proceso de captación y de detoxificación de la endotoxina que llega del flujo venoso portal (484,485). Al igual que otros fagocitos mononucleares actúan como células presentadoras de antígenos activando la respuesta inmune derivada de los linfocitos T (486) y también pueden desencadenar una respuesta citotóxica semejante a la realizada por las células *natural killer* para eliminar células tumorales circulantes (487). Por último, la activación de las células de Kupffer da lugar a la secreción de potentes mediadores

biológicos como radicales libres derivados del oxígeno, intermediarios del nitrógeno, numerosas citoquinas y eicosanoides (444).

Las células de Kupffer se activan por partículas fagocitadas y por la unión a través de receptores específicos de compuestos como ésteres de forbol, LPS, factor del complemento C5a, factores de crecimiento como GM-CSF o M-CSF, IFN γ y TNF α (444). La endotoxina procedente de *Escherichia coli* o de otras bacterias suele ser el compuesto habitualmente utilizado en el estudio de la activación de estos macrófagos (444). Se considera que los signos indicativos de la activación de las células de Kupffer son el incremento de su actividad fagocítica, mitosis, el aumento de la rugosidad de la membrana, así como la liberación de numerosos compuestos con actividad biológica. Entre éstos destacan los mediadores inorgánicos como el ión superóxido producidos de forma inmediata por la célula de Kupffer con el fin de inactivar y destruir el material fagocitado (488). Además de los radicales libres del oxígeno, las células de Kupffer activadas sintetizan óxido nítrico, proteasas, TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, TGF β , IFN α o γ , ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos (444). Algunos de estos productos son también estimuladores o inhibidores de su propia síntesis y la de otros mediadores. Así por ejemplo, el TNF α estimula la síntesis de PGE₂ que a su vez inhibe la liberación de TNF α . O por ejemplo el IFN γ que estimula la producción de PGE₂ y TNF α a la vez que suprime la síntesis de IL-1 (489). También se ha comprobado tanto *in vitro* como *in vivo* que el IFN γ puede desencadenar una respuesta citotóxica de las células de Kupffer contra células tumorales (490,491). Gran parte de los mediadores liberados por las células de Kupffer ejercen sus acciones de forma paracrina sobre las células adyacentes. Por ejemplo, la IL-1 por si misma o en combinación con la IL-6 y el TNF α no sólo modula la síntesis de DNA y proteína en los hepatocitos, sino también el metabolismo de glúcidos y lípidos y la

síntesis de albúmina en estas células (492). Asimismo se ha demostrado que eicosanoides liberados por la célula de Kupffer como el LTB₄ y la PGE₂, inducen la secreción de IL-8 en los hepatocitos circundantes (493).

3.1.3. Heterogeneidad morfológica y funcional

La población de células de Kupffer no se encuentra distribuida de forma homogénea a lo largo del acino hepático, y de hecho, existe el doble número de células de Kupffer en el área periportal que en la área perivenular (465). Esta localización tan dependiente del grado de aporte sanguíneo, hace que las células de Kupffer de la región periportal sean más grandes, posean mayor actividad lisosomal y fagocítica y generen menor cantidad de anión superóxido que las células de la región centrolobular (465,494,495). El aislamiento de este tipo de macrófagos del hígado de rata también demuestra la existencia de subpoblaciones celulares que difieren en tamaño. A pesar de que todas estas células presentan actividad peroxidasa endógena según el patrón característico de los macrófagos residentes, y positividad para marcadores como la esterasa no-específica y ED2, la intensidad de la tinción se muestra heterogénea (496). La intensidad del marcaje disminuye proporcionalmente al tamaño celular, lo que sugiere que las células más pequeñas poseen también un fenotipo más inmaduro. La heterogeneidad fenotípica en las células de Kupffer humanas también se ha demostrado histológicamente utilizando anticuerpos monoclonales contra antígenos de macrófagos como el CD68 y el 25-F9 (497,498). Mientras que la mayoría de macrófagos son positivos para CD68, son menos numerosos los macrófagos maduros que presentan positividad para el 25-F9, un marcador específico de macrófagos diferenciados. Además, se encuentran tanto células doble positivas para los dos antígenos como células positivas sólo para CD68 (497,498).

Por último, el análisis cuantitativo sugiere que la maduración de los macrófagos hepáticos es también heterogénea.

La heterogeneidad morfológica de las células de Kupffer se asocia a heterogeneidad funcional. Así, los macrófagos de mayor tamaño poseen mayor capacidad fagocítica, producen más $\text{TNF}\alpha$, IL-1 y PGE_2 y poseen mayor capacidad proliferativa frente a un estímulo como el CSF-1 o el GM-CSF (499). Por el contrario, los macrófagos de menor tamaño son más susceptibles a ser activados, expresan mayores cantidades de antígeno Ia, liberan mayores cantidades de óxido nítrico y anión superóxido y presentan mayor actividad citotóxica contra células tumorales (500). El conjunto de estas observaciones sugiere que existe una relación estrecha entre la funcionalidad, maduración y tamaño de las células de Kupffer. Además, la localización en la zona periportal de los macrófagos de mayor tamaño, los que poseen mas actividad fagocítica y menos actividad inflamatoria, explicaría la relativa tolerancia del hígado para los agentes inmunógenos que tienen su acceso a este órgano por la vena porta.

3.1.4. Origen y cinética de las células de Kupffer

En la actualidad todavía existe una gran controversia sobre el origen y la capacidad proliferativa de las células de Kupffer en condiciones normales. De acuerdo con el concepto de sistema mononuclear fagocítico, los macrófagos residentes en un tejido proceden del reclutamiento de monocitos circulantes y por lo tanto serían células muy especializadas de vida corta, terminalmente diferenciadas y sin capacidad proliferativa (501). Sin embargo en estudios experimentales, se ha observado que la población de macrófagos tisulares o de sus precursores no se ve afectada por la inducción de monocitopenia severa mediante la administración de Sr^{89} o la irradiación fraccionada de la

médula ósea (502-504). Estas observaciones serían compatibles con el concepto actualmente vigente de que en condiciones normales, la población de células de Kupffer es capaz de proliferar localmente y mantenerse durante largos periodos de tiempo sin el aporte de monocitos circulantes (502,504,505). De hecho, estudios de ontogenia hepática demuestran la existencia en el hígado de dos tipos de macrófagos de distinto origen hematopoyético (506). Según estos estudios, existiría una población de macrófagos procedentes de los monocitos circulantes originados en la médula ósea y otra población de macrófagos tisulares resultantes de la hematopoyesis temprana acontecida durante el desarrollo embrionario (507).

La capacidad proliferativa de las células de Kupffer ha sido también analizada en distintos modelos experimentales. Los resultados de estos estudios confirman el potencial mitótico de estas células en condiciones normales (494,504,505,508), y la posibilidad de modular tanto *in vivo* como *in vitro* su maduración y capacidad proliferativa mediante factores solubles como por ejemplo el M-CSF (509-511).

La capacidad proliferativa de las células de Kupffer adquiere mayor relevancia en el curso de la enfermedad hepática. En este sentido, se ha descrito que la población de células de Kupffer incrementa significativamente durante las etapas iniciales de la lesión hepática (512). En el caso concreto de la fibrogénesis inducida por CCl₄, la población de células de Kupffer triplica su número original aproximadamente entre las 6 y las 8 semanas de tratamiento (513). Además, en este modelo experimental existe una correlación muy estrecha entre el número de células de Kupffer y el grado de desarrollo de fibrosis (514-517). Sin embargo, una vez la cirrosis se ha establecido, el número de células de Kupffer disminuye significativamente coincidiendo con la aparición de una alteración en la función retículo-endotelial y fagocítica del hígado (518). En el momento actual no se conoce con exactitud si el aumento de la población hepática de células de Kupffer durante la lesión

aguda y crónica por CCl₄ es consecuencia del reclutamiento de monocitos circulantes o a la proliferación local de células de Kupffer, pero posiblemente sea el resultado de ambos procesos (519,520).

3.1.5. Papel de las células de Kupffer en la lesión hepática

Existen actualmente evidencias sólidas que demuestran la participación de las células de Kupffer en la patogénesis de la enfermedad hepática. Se sabe que estímulos como la obesidad, el consumo crónico de alcohol, la endotoxina o compuestos procedentes de la degradación de fármacos y xenobióticos inducen la activación de las células de Kupffer. Una vez activadas, las células de Kupffer liberan cantidades masivas de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF α), radicales libres de oxígeno y aniones superóxido, IFN α y γ y eicosanoides (PGD₂, PGE₂ y LTs). La liberación desproporcionada de estos mediadores junto con la secreción de enzimas lisosomales por las células de Kupffer favorece la aparición de inflamación y necrosis en el tejido hepático. Las células de Kupffer activadas modifican también procesos metabólicos claves en las células parenquimatosas, como por ejemplo la liberación de albúmina por los hepatocitos, lo que altera la función hepática y contribuye al desarrollo de la lesión en este órgano (446). Tal como se ha apuntado anteriormente, además de ser el principal tipo celular responsable de la liberación de productos biológicamente activos, las células de Kupffer activadas incrementan significativamente su número en el hígado. Por ejemplo, en las 6 horas posteriores a la administración de CCl₄ se produce un aumento de la población de células de Kupffer, presentando un pico máximo a las 72 horas (520). Una prueba definitiva del papel clave de las células de Kupffer en la lesión hepática es que su inactivación y eliminación selectiva mediante cloruro de gadolinio (GdCl₃) impide que aparezcan valores

séricos elevados de aspartato aminotransferasa (AST) y la muerte de las células hepáticas parenquimales tras la administración de CCl_4 (521).

Como se ha comentado anteriormente, las células de Kupffer activadas liberan numerosos compuestos que pueden tener un efecto estimulador y proliferativo directo sobre las HSC que constituyen la principal fuente de proteínas de matriz extracelular en el hígado durante el proceso de fibrosis (415). Pero además existen otros mecanismos por los que las células de Kupffer pueden activar a las HSC esto es, mediante la degradación de la matriz extracelular sub-endotelial, la cual como es sabido, mantiene a las HSC en su estado quiescente (415). En concreto, las células de Kupffer activadas son las principales productoras de colagenasa tipo IV/gelatinasa tipo B con capacidad de digerir esta matriz extracelular, y por tanto de inducir la activación, proliferación y migración de las HSC (446,522).

OBJETIVOS

La fibrosis hepática es el resultado de un proceso inflamatorio y de reparación de tejido en respuesta a un daño hepático prolongado y se define como la acumulación de tejido conectivo en el hígado debido a un importante desequilibrio entre la producción y la degradación de matriz extracelular. Mientras que la fibrosis hepática es un proceso reversible, su estadio final, la cirrosis, está considerado como el estadio irreversible y final de la enfermedad. Cuando la cirrosis es ya severa se produce la completa desestructuración del parénquima hepático dando lugar a la aparición de insuficiencia hepática y trastornos hemodinámicos graves. Una de las primeras complicaciones hemodinámicas es la aparición de hipertensión portal que tiene lugar como consecuencia de un incremento de la resistencia intrahepática al paso de flujo sanguíneo portal así como de un aumento intrínseco del tono vascular de la microvasculatura hepática. Existe un enorme interés científico no sólo por esclarecer los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática sino también por identificar nuevas estrategias terapéuticas enfocadas a revertir o prevenir la progresión de esta enfermedad hepática.

Una de las posibles dianas terapéuticas la constituye la vía biosintética de la 5-LO. La 5-LO es la enzima clave responsable de la síntesis de LTs, importantes mediadores lipídicos derivados del AA. Este grupo de eicosanoides incluye al LTB₄ implicado principalmente en la respuesta inflamatoria y los cisteinil-LTs (LTC₄/LTD₄/LTE₄) que son potentes agentes vasoconstrictores capaces de incrementar la permeabilidad vascular y ejercer importantes funciones proliferativas y profibrogénicas. En el hígado y a nivel experimental, los cisteinil-LTs son capaces de modificar tanto la presión hepática de perfusión como la extravasación de fluido vascular. Además, los estudios clínicos demuestran que en los pacientes con hepatopatía existe un incremento en la producción de estos eicosanoides lo que se ha asociado con el desarrollo de un incremento en la

resistencia intrahepática y la aparición de colestasis. Sin embargo y hasta la realización de este proyecto de tesis doctoral, no se conocían con exactitud los mecanismos celulares de síntesis de estos eicosanoides en el hígado así como la implicación fisiopatológica de estos compuestos en el desarrollo de la cirrosis hepática y sus complicaciones.

Por todo ello, los objetivos generales de este trabajo fueron:

Estudio I:

1. Investigar tanto la expresión de la 5-LO como la producción hepática de cisteinil-LTs durante el proceso de cirrosis hepática experimental inducida por la inhalación de CCl₄ en la rata.
2. Caracterizar la biosíntesis de cisteinil-LTs en el sinusoides hepático.
3. Investigar el efecto paracrino de los cisteinil-LTs sobre las HSC y su papel en el desarrollo del aumento de las resistencias intrahepáticas y la aparición de hipertensión portal en la cirrosis.

Estudio II:

1. Investigar el papel de la 5-LO en la supervivencia de las células de Kupffer *in vitro* mediante la utilización de inhibidores específicos de la enzima.
2. Determinar la eficacia de la administración *in vivo* de un inhibidor específico de la 5-LO en la prevención de la formación de fibrosis en ratas tratadas con CCl₄.
3. Investigar el efecto de la administración *in vivo* de un inhibidor específico de la 5-LO sobre la población de células de Kupffer durante el desarrollo de fibrosis experimental

RESULTADOS

1. Artículo 1: Los cisteinil-LTs producidos por los hepatocitos modulan el tono vascular hepático en la cirrosis experimental

Los cisteinil-LTs son eicosanoides derivados de la 5-LO con potentes propiedades vasoconstrictoras, proliferativas y profibrogénicas y pueden jugar un papel importante durante el proceso fisiopatológico que tiene lugar en la cirrosis hepática. En este primer trabajo se examinó inicialmente la expresión de la 5-LO y los niveles de cisteinil-LTs en el hígado de ratas control y ratas con cirrosis inducida por la inhalación de CCl₄. Posteriormente se caracterizó la vía biosintética de los cisteinil-LTs a nivel celular hepático y se estudiaron las propiedades vasoactivas del LTD₄ *in vitro* en células hepáticas estrelladas (HSCs) e *in vivo* en ratas normovolémicas anestesiadas. Los resultados se resumen a continuación:

1. La expresión de la 5-LO y la producción de cisteinil-LTs se encuentran significativamente elevadas en el hígado de ratas cirróticas

En primer lugar se analizó por Northern blot la expresión del RNA mensajero (mRNA) de la 5-LO en el hígado procedente de ratas control y ratas con cirrosis hepática inducida por la inhalación de CCl₄. Mientras que en el tejido hepático de las ratas control no se observó señal detectable de la expresión de la 5-LO, en el hígado de las ratas cirróticas se detectó una marcada sobreexpresión de esta enzima. Además, el análisis de los niveles hepáticos de cisteinil-LTs en estos mismos animales demostró la existencia de un incremento significativo en la producción de estos eicosanoides en el tejido hepático de las ratas con cirrosis.

2. Los hepatocitos no expresan la 5-LO pero son los principales productores de cisteinil-LTs en el hígado mediante metabolismo transcelular

Con el objetivo de caracterizar la fuente celular de cisteinil-LTs en el hígado y dado que los hepatocitos son el tipo celular predominante en este órgano, se analizó por RT-PCR la expresión de la 5-LO en hepatocitos purificados procedentes de ratas control y ratas cirróticas. Paralelamente se realizaron los mismos experimentos con la línea celular de hepatocitos de rata CC-1. El análisis de los productos de PCR demostró la ausencia de expresión de la 5-LO tanto en hepatocitos aislados de ratas control como en hepatocitos procedentes de las ratas cirróticas. Tampoco se detectó 5-LO en células CC-1 en condiciones basales ni después de la estimulación con LPS o IL-6. El análisis posterior de la expresión de esta enzima en los distintos tipos celulares no parenquimales hepáticos, evidenció que en el hígado, la 5-LO parece estar restringida a las células de Kupffer. Sin embargo, y a pesar de no presentar 5-LO, los hepatocitos son capaces de producir cisteinil-LTs a partir del metabolito intermediario LTA₄. Además, de entre los distintos tipos celulares hepáticos los hepatocitos son las células con mayor capacidad de síntesis de cisteinil-LTs a través de este metabolismo transcelular.

3. Los hepatocitos procedentes de ratas cirróticas producen mayores cantidades de cisteinil-LTs que los procedentes de ratas control

Los hepatocitos recién aislados procedentes de las ratas cirróticas producen basalmente mayores niveles de cisteinil-LTs que los procedentes de animales control sin embargo, cuando se añade LTA₄ de forma exógena los hepatocitos de las ratas cirróticas tienen la misma capacidad que los hepatocitos control para la síntesis de estos eicosanoides.

4. Los cisteinil-LTs actúan de forma paracrina sobre las células hepáticas estrelladas (HSCs)

Tanto el LTD₄ como el medio condicionado de hepatocitos incrementa los niveles intracelulares de Ca²⁺ e induce la contracción de las HSCs lo que sugiere que estos metabolitos liberados por los hepatocitos pueden actuar de forma paracrina sobre las células adyacentes no parenquimales.

5. La administración de LTD₄ a ratas normovolémicas incrementa la presión portal

La relevancia de estos resultados se examinó *in vivo* en ratas normales anestesiadas y se observó que la administración de LTD₄ incrementa de forma significativa la presión portal en estos animales.

2. Artículo 2: La inhibición de la 5-lipooxigenasa induce la apoptosis de las células de Kupffer: implicaciones en la fibrosis hepática

Durante el proceso inflamatorio que tiene lugar previo al desarrollo de fibrosis hepática juega un papel fundamental tanto el incremento en el número de células de Kupffer como el grado de activación de estos macrófagos específicos del hígado. Basándonos en los datos existentes en la literatura que demuestran que la 5-LO juega un papel clave en el crecimiento y la supervivencia celular de distintos tipos celulares, en este segundo trabajo se examinó si la inhibición de esta vía metabólica era capaz de reducir el excesivo número de células de Kupffer y así atenuar el proceso inflamatorio y de fibrosis en el modelo experimental de enfermedad hepática en la rata por inhalación crónica de CCl₄. Los resultados se resumen a continuación:

1. Las células de Kupffer son el único tipo celular hepático que presenta la maquinaria enzimática completa y metabólicamente activa de la vía de la 5-LO

En el artículo 1 de esta tesis se demostró que la expresión de la 5-LO así como la producción de cisteinil-LTs estaba aumentada en el hígado procedente de ratas con cirrosis inducida por la inhalación de tetracloruro de carbono (CCl₄). Para averiguar la distribución celular de la vía de la 5-LO se aislaron los diferentes tipos celulares hepáticos, se extrajo el RNA de cada uno de ellos y se sometió a RT-PCR para cada una de las enzimas clave de la ruta biosintética de la 5-LO. Como ya se había observado parcialmente en el primer trabajo, la célula de Kupffer coexpresa de forma consistente los RNA mensajeros (RNAm) para la 5-LO, su proteína activadora (FLAP) y la LTC₄ sintasa. Sin embargo, ni los hepatocitos ni las células endoteliales sinusoidales y las HSC demostraron la presencia de

niveles detectables de 5-LO. El RNAm de la FLAP se encontró de forma constitutiva en hepatocitos, células de Kupffer y HSC mientras que el RNAm de la LTC₄ sintasa se encontró únicamente en hepatocitos y células de Kupffer.

Estos resultados indican que la célula de Kupffer es aparentemente el único tipo celular hepático capaz de metabolizar el AA para dar lugar a eicosanoides derivados de la 5-LO. De hecho, las células de Kupffer en cultivo generan niveles significativos de LTB₄ y de cisteinil-LTs.

2. La inhibición de la 5-LO reduce el crecimiento de las células de Kupffer *in vitro*

Las células de Kupffer son capaces de proliferar *in vitro* demostrándose un crecimiento significativo después de 6 días en cultivo en medio RPMI1640 suplementado con un 10% de FBS. Además, el factor estimulador de crecimiento de colonias de macrófagos (M-CSF) estimula el crecimiento de estas células de manera dosis dependiente. Por el contrario, el número de células de Kupffer se reduce significativamente cuando se cultivan con un inhibidor específico de la 5-LO, el AA-861 y con un inhibidor de la acción de la FLAP, el Bay-X-1005. En concreto, el AA-861 a las dosis de 5 y 10 μ M produce una disminución del número de células del 35.8 y 38.2%, respectivamente mientras que el Bay-X-1005 a las dosis de 30 y 40 μ M reduce la población celular un 42.3 y 41.8%, respectivamente.

3. Los efectos antiproliferativos de la inhibición de la 5-LO se asocian a la inducción de apoptosis

Para investigar si los efectos antiproliferativos de los inhibidores AA-861 y Bay-X-1005 estaban asociados a una inducción de apoptosis se desarrollaron diferentes aproximaciones metodológicas en células de Kupffer y en células THP-1, tales como los estudios de la morfología celular, el análisis de la fragmentación del DNA y la detección

por citometría de flujo de unión de la anexina V y del contenido de DNA. La tinción nuclear con yoduro de propidio de las células de Kupffer incubadas con AA-861 (5 μM) y con Bay-X-1005 (30 μM) demostró la existencia de un incremento en el número de núcleos que presentaban una compactación de la cromatina típica del proceso apoptótico en comparación con las células tratadas con vehículo. La tinción de las células THP-1 con Diff-Quick[®] después de la incubación con AA-861 (15 μM) o Bay-X-1005 (30 μM) también demostró un comportamiento apoptótico característico en comparación con las células tratadas con vehículo. En este caso, las células tratadas con los inhibidores de la 5-LO se encogen, muestran un núcleo picnótico y en algunos casos un incremento de la vacuolización citoplasmática. La degradación internucleosomal del DNA en fragmentos múltiples de 180 pb produciendo el típico patrón en un gel de agarosa de DNA *en escalera* también se demostró de forma evidente en células THP-1 incubadas con AA-861 (10 y 15 μM) y Bay-X-1005 (30 y 40 μM). Estos resultados se confirmaron después del análisis por citometría de flujo del contenido de DNA que mostró la presencia de un incremento en el número de eventos del pico sub-G₀/G₁ en las células tratadas con AA-861 o con Bay-X-1005.

4. La administración oral del inhibidor Bay-X-1005 mostró efectos hepáticos antifibróticos *in vivo*

Para investigar la relevancia de estos resultados *in vivo*, se evaluaron los efectos de la administración oral diaria del inhibidor de la 5-LO Bay-X-1005 (100 mg/Kg) a ratas sometidas al proceso de fibrosis hepática por inhalación de CCl₄. El análisis histológico de secciones de tejido hepático evidenció como era de esperar, que inicialmente el tratamiento con CCl₄ produce importantes cambios celulares tales como inflamación, necrosis hepatocelular y esteatosis. La administración de Bay-X-1005 a ratas tratadas con CCl₄

ejerció un marcado efecto protector ya a la 4ª semana del tratamiento, evidenciándose la ausencia de necrosis o degeneración hepatocelular en estos animales (ver resultados 3.1 del anexo al artículo 2). A partir de la 8ª semana, la inhalación de CCl₄ produce una importante desestructuración de la arquitectura hepática con una gran deposición de colágeno formando puentes fibróticos entre los espacios porta y escasas regiones con hepatocitos viables. La administración oral del inhibidor Bay-X-1005 durante 8 semanas, atenuó significativamente los daños hepatocelulares, la fibrosis así como los niveles hepáticos de hidroxiprolina inducida por el CCl₄ en comparación con los animales que recibieron placebo.

5. La administración de Bay-X-1005 redujo significativamente el número de células de Kupffer en el hígado de ratas tratadas con CCl₄.(ver ANEXO al artículo 2)

Por último y para evaluar el papel de las células de Kupffer durante el daño hepático producido por el CCl₄, se determinó el número de estos macrófagos mediante microscopía óptica en secciones histológicas de tejido hepático marcadas con el anticuerpo ED-2, un marcador específico de células de Kupffer. Como se puede observar en los resultados presentados en el anexo 2, y en comparación con el grupo control, el tratamiento con CCl₄ produjo un incremento significativo en el número de células de Kupffer. Además, la administración del inhibidor Bay-X-1005 a ratas tratadas con CCl₄ redujo de forma significativa el número de estos macrófagos en el hígado de estos animales.

DISCUSIÓN

Los resultados del primer estudio indicaron claramente la existencia de una inducción de la vía metabólica de la 5-LO en el hígado cirrótico de ratas tratadas con CCl₄. En concreto, se observó la inducción de la expresión del mRNA de la 5-LO en el hígado de los animales con cirrosis, resultado que iba en paralelo con un incremento en la producción hepática de cisteinil-LTs. Es importante señalar que, si bien por RT-PCR sí que detectamos una ligera expresión del mRNA de la 5-LO en los hígados de las ratas control, la expresión fue prácticamente indetectable en los ensayos de Northern blot. Estos resultados en apariencia contradictorios, se explican por la escasa abundancia del mensajero de la 5-LO en el hígado normal que impide su detección mediante la técnica de Northern blot.

A nivel celular hepático y en los últimos años, la presencia de la 5-LO en los hepatocitos de la rata ha sido motivo de controversia. En los primeros trabajos publicados al respecto, se observó que los hepatocitos de rata en cultivo liberaban al medio una sustancia con propiedades quimiotácticas perteneciente a la vía metabólica de la 5-LO (como por ejemplo el LTB₄ o el 5-HETE) (523,524). Sin embargo, estudios más recientes demostraron la ausencia de actividad 5-LO en estas células (525,526) por lo que la presencia de metabolitos de la 5-LO en el medio de cultivo podía ser debida a la utilización de cultivos no purificados y por lo tanto a la presencia de otros tipos celulares hepáticos capaces de sintetizar estos eicosanoides. En nuestro caso, realizamos todos los experimentos con hepatocitos altamente purificados y de la misma manera que Shimada y colaboradores (525), cuyo trabajo se publicaba durante la realización de esta tesis, tampoco detectamos por RT-PCR ninguna evidencia de la expresión del mRNA de la 5-LO en los hepatocitos de la rata.

Dada la ausencia de actividad enzimática 5-LO en hepatocitos, la producción de cisteinil-LTs por estas células era muy probable que tuviera lugar a través de metabolismo

transcelular. El metabolismo transcelular es una vía bioquímica alternativa muy importante en la síntesis de eicosanoides (527). Este tipo de proceso metabólico implica la interacción entre células y tiene lugar cuando un intermediario metabólico generado por una célula (célula donadora) es captado y procesado por una célula vecina (célula aceptora) formando el eicosanoide activo que ninguna de estas células por separado puede generar. La producción de cisteinil-LTs por estas rutas transcelulares tiene lugar de forma reconocida en determinados sucesos vasculares durante la interacción de las plaquetas con las células endoteliales o bien con neutrófilos (528). En el contexto celular hepático en el que nosotros trabajamos hemos observado que la expresión de la 5-LO está restringida a las células de Kupffer. Además, este dato unido al hecho de que los hepatocitos son una fuente muy abundante de actividad LTC₄ sintasa (529-531) sugiere que la producción de cisteinil-LTs en el hígado tiene lugar por medio de metabolismo transcelular. Así, las células de Kupffer serían las responsables de la liberación hepática de LTA₄, el intermediario metabólico de la síntesis de cisteinil-LTs y los hepatocitos a través de metabolismo transcelular, constituirían la principal fuente de estos eicosanoides en el hígado. De hecho, cuando los diferentes tipos celulares hepáticos se incubaron con LTA₄, encontramos que los hepatocitos eran las células con mayor capacidad para la síntesis de cisteinil-LTs y que la síntesis de estos eicosanoides por parte de las células de Kupffer, HSCs y SECs era casi insignificante. Además, considerando que los hepatocitos constituyen más del 90% de la masa celular hepática y que poseen una elevada actividad LTC₄ sintasa (525,529,531,532), nuestros resultados indican que estas células juegan un papel significativo en la síntesis hepática de cisteinil-LTs.

En ausencia de LTA₄ exógeno, los hepatocitos procedentes de las ratas con cirrosis liberan mayor cantidad de cisteinil-LTs que los hepatocitos aislados de los animales control. Este resultado podría ser consecuencia de la existencia de dos fenómenos

caracterizados experimentalmente en otros tipos celulares. En primer lugar, se ha propuesto la existencia de un *pool* intracelular de de LTs en células epiteliales parenquimales (533). Así en los hepatocitos, la biosíntesis basal inducida de cisteinil-LTs que observamos en la cirrosis podría ser causada no sólo por un incremento en la liberación al medio de estos eicosanoides sino también por la liberación al medio de un *pool* aumentado de cisteinil-LTs sintetizado previamente. Sin embargo, y en segundo lugar, se ha descrito en una línea celular de leucemia basofílica de la rata la existencia de una proteína citosólica de unión a ácidos grasos capaz de estabilizar al intermediario LTA₄ permitiendo alargar su vida media jugando así un papel clave en el metabolismo transcelular (534). De este modo, en la cirrosis existiría un incremento en la síntesis de LTA₄ el cual hipotéticamente sería estabilizado en el citosol de los hepatocitos que una vez aislados liberarían al medio mayores cantidades de cisteinil-LTs. En cualquier caso, es necesario y de gran interés el desarrollo de nuevos estudios enfocados a caracterizar los mecanismos implicados en este fenómeno. En nuestros experimentos, cuando los hepatocitos de las ratas cirróticas se incubaron con LTA₄, se produjeron niveles de cisteinil-LTs muy similares a los de los hepatocitos control. Así en la rata, la biosíntesis de cisteinil-LTs por los hepatocitos parece estar limitada a la disponibilidad de LTA₄ y no a la capacidad de estas células para transformar al LTA₄ en estos eicosanoides. Además, los resultados que muestran niveles proteicos similares de LTC₄ sintasa en hígado control y cirrótico apoyan esta idea.

La síntesis de cisteinil-LTs por los hepatocitos podría ser de gran importancia fisiológica y fisiopatológica. El hecho de que estos eicosanoides tengan una vida media muy corta en el microambiente extracelular sugiere que los cisteinil-LTs liberados por los hepatocitos pueden funcionar como autacoides lipídicos, ejerciendo acciones locales rápidas y transitorias sobre las células adyacentes (27,417,527). Fisiológicamente y debido

a la situación estratégica de las HSC dentro del espacio de Disse, en estrecho contacto con los hepatocitos, sitúa a este tipo celular como diana potencial de los cisteinil-LTs. Las HSCs activadas tienen propiedades contráctiles y poseen receptores para diferentes sustancias vasoactivas por ello, se considera que juegan un papel clave en la regulación del flujo sanguíneo hepático sinusoidal (535-537). De hecho, existen numerosos estudios funcionales que demuestran la capacidad de estas células para relajarse y contraerse en respuesta a agentes vasoactivos y de este modo modular el diámetro de los sinusoides hepáticos (535-537). Nuestros resultados muestran que las HSCs responden a la administración de LTD₄ con un marcado incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ y en la contracción celular. La magnitud de esta respuesta inducida por el LTD₄ fue superior a la obtenida con cualquier otro vasoconstrictor (535) y fue similar a la respuesta provocada por el LTD₄ en células musculares lisas de la tráquea (538). Una hipótesis interesante sería que en el sinusoides hepático, el LTD₄ liberado por los hepatocitos difunde por el espacio de Disse e induce en las HSC un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ y en la contracción celular. De hecho, los resultados obtenidos cuando recogimos el medio condicionado de hepatocitos incubados con LTA₄ para testar su actividad sobre HSCs aisladas confirmaron esta hipótesis. Este medio condicionado produjo un incremento considerable sobre la concentración intracelular de Ca²⁺ y la contracción celular además, esta respuesta fue específica de una acción del LTD₄ pues la utilización del antagonista específico del receptor Cys-LT₁, el MK 571 revirtió estos efectos. Todos estos datos apoyan la idea de que los cisteinil-LTs derivados de los hepatocitos actúan de forma paracrina sobre las células adyacentes no parenquimales y sugieren que el incremento en la síntesis hepática de estos eicosanoides en las ratas con cirrosis inducida por CCl₄, puede alterar el flujo sanguíneo sinusoidal local y contribuir así al desarrollo de hipertensión portal en estos animales. La presencia de niveles hepáticos elevados de cisteinil-LTs en los

estadios previos al desarrollo de cirrosis podría ser indicativo de que este fenómeno tiene lugar tempranamente durante el curso de la enfermedad hepática.

En conclusión, los resultados de este primer estudio indican que los hepatocitos pueden jugar un papel activo en la regulación del tono vascular hepático en la cirrosis mediante la liberación de potentes eicosanoides derivados de la 5-LO (por ejemplo, los cisteinil-LTs). Dado que además, los cisteinil-LTs estimulan la proliferación celular y la síntesis de colágeno (255,256,263,539), la producción de estos eicosanoides por los hepatocitos puede ser también relevante en la patogénesis de la fibrosis hepática. La disponibilidad de inhibidores específicos de la 5-LO así como de antagonistas de los receptores de los cisteinil-LTs permitirá esclarecer el papel patofisiológico de estos eicosanoides y poder desarrollar en un futuro nuevas estrategias terapéuticas en la enfermedad hepática.

En el segundo trabajo analizamos el papel de la 5-LO en la fibrosis hepática experimental desde otro punto de vista. En este caso abordamos el estudio del efecto de la inhibición de la 5-LO sobre la supervivencia de las células de Kupffer *in vitro* y además determinamos la eficacia de la administración *in vivo* de un inhibidor específico de la actividad 5-LO en la prevención de la formación de fibrosis en ratas sometidas a CCl₄.

De entre los distintos tipos celulares hepáticos, las células de Kupffer han sido las históricamente consideradas capaces de producir muchos de los metabolitos derivados del AA incluyendo el LTB₄ y los cisteinil-LTs (417). De hecho, y tal y como hemos podido comprobar en nuestro laboratorio, las células de Kupffer son el único tipo celular hepático que posee la maquinaria enzimática completa necesaria para la síntesis de LTs. Así, y aunque no se excluye la existencia en un hígado inflamado de otros tipos celulares capaces de expresar la 5-LO, (como por ejemplo, leucocitos reclutados -monocitos o neutrófilos

circulantes), escogimos a la célula de Kupffer como diana para estudiar a nivel celular hepático esta vía metabólica.

Durante la primera etapa inflamatoria previa al desarrollo de fibrosis hepática se producen una serie de eventos clave para el desarrollo de esta hepatopatía tales como un aumento en el número de células de Kupffer así como una mayor liberación de mediadores inflamatorios derivados de estos macrófagos (446,514-517). Sin embargo, actualmente se desconoce si el aumento de la población de estos macrófagos residentes es consecuencia de un incremento en la proliferación de las células de Kupffer o bien se debe a la diferenciación de monocitos reclutados en el hígado a células de Kupffer. Los macrófagos tisulares generalmente se han considerado células terminalmente diferenciadas con ninguna o mínima capacidad para proliferar (540). Sin embargo, nuestros resultados indican que las células de Kupffer conservan cierta capacidad para proliferar en cultivo y además que este crecimiento puede estimularse mediante la incubación con M-CSF, factor de crecimiento soluble liberado por los hepatocitos (541). Estos resultados se encuentran en la línea de estudios previos que demuestran que las células de Kupffer pueden proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* (494,509,542) y apoyan una teoría más actual que supone que los macrófagos hepáticos pueden proliferar de forma local y mantener de esta manera su población celular en el hígado. Además, se ha demostrado que la población de células de Kupffer presenta una heterogeneidad morfológica y funcional. Constituye una población heterogénea que incluye células de diferente tamaño y funcionalidad así, los macrófagos más grandes tendrían más capacidad proliferativa que los de menor tamaño (509).

Para inhibir la vía biosintética de la 5-LO utilizamos dos tipos de inhibidores, el AA861 y el Bay-X-1005. El compuesto AA861 es un derivado de la benzoquinona de acción antioxidante que inhibe la actividad de la 5-LO por competición con el sustrato de esta enzima (543). El Bay-X-1005 es un derivado de la quinolina que actúa sobre la

proteína activadora de la 5-LO (FLAP) inhibiendo de forma competitiva no sólo la unión del substrato a la FLAP sino también la translocación de la de la 5-LO del citosol a la membrana nuclear (339). Uno de los puntos clave de este segundo trabajo fue comprobar que ambos compuestos eran capaces de disminuir el número de células de Kupffer en cultivo. Los efectos inhibidores de la supervivencia de las células de Kupffer producidos por el AA861 y el Bay-X-1005 fueron comparables a las acciones descritas previamente por el AA861, el ácido nordihidroguaiáico (NDGA, inhibidor no selectivo de las LOs) o el MK886 (inhibidor selectivo de la FLAP) en otros tipos celulares como neutrófilos y células sanguíneas mononucleadas humanas, así como en cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo y en células endoteliales (380,381,544,545). También se han obtenido resultados similares al tratar diferentes líneas celulares humanas cancerígenas (leucemia, mesotelio, pulmón, próstata y páncreas) con NDGA, AA861, MK866 o Rev5901 (178,379,391,546-548). Cualquier eicosanoide derivado de la metabolización del AA por la 5-LO ya sea el 5-HETE, el LTB₄ o los cisteinil-LTs podría ser el responsable del efecto antiproliferativo de la inhibición de esta enzima. Sin embargo, las células de Kupffer no producen cantidades detectables de 5-HETE y al LTB₄ no se le conocen hasta la fecha propiedades proliferativas por sí solo (257). Por esto, los cisteinil-LTs podrían ser los principalmente involucrados en la supervivencia de las células de Kupffer (255,257). De hecho, después de la inhibición de la 5-LO hemos observado una disminución en los niveles hepáticos de cisteinil-LTs que se correlacionan con la reducción de la supervivencia de las células de Kupffer de la rata. Además, en los ensayos con el inhibidor de la FLAP la supervivencia celular se pudo rescatar parcialmente por la adición de LTD₄ al medio de cultivo.

Para conocer mejor el papel de la vía de la 5-LO en la regulación del crecimiento celular, quisimos averiguar si los efectos antiproliferativos de los inhibidores de la 5-LO

estaban asociados a una inducción de apoptosis. Para detectar la aparición de la muerte celular programada utilizamos cuatro métodos distintos tales como la visualización de la “escalera de DNA” o DNA *laddering* y el análisis de la morfología celular así como de la unión de la anexina V y del contenido de DNA. Tanto el AA861 como el Bay-x-1005 inducen importantes cambios a nivel de la morfología celular y de la frecuencia de distribución del contenido de DNA, eventos que junto con la aparición de DNA *laddering*, son considerados como característicos de las células que entran en apoptosis. Sin embargo, no observamos que el AA861 o el Bay-X-1005 indujeran la unión de la anexina V. Esta observación en un principio sorprendente, está en línea de estudios previos en los que no se consigue detectar la externalización de fosfatidilserina mediante la unión de la anexina V en células HL60 tratadas con camptofecina, en células Raji cultivadas a bajas concentraciones de suero y en células U937 incubadas con anti-Fas (549,550). Sin embargo, este fenómeno parece depender más del estímulo que del tipo celular estudiado ya que otros trabajos han detectado apoptosis en células U937 estimuladas con TNF α mediante la detección de la unión de anexina V marcada con FITC (551). Aún así, los efectos apoptóticos producidos por el AA861 y el Bay-X-1005 en nuestras células son similares a los publicados previamente en diferentes líneas celulares humanas cancerígenas tratadas con AA861, NDGA y MK886 (379,386,388,548,552).

El mecanismo por el cual los inhibidores de la 5-LO inducen apoptosis no se conoce con exactitud. Se han sugerido multitud de eventos moleculares que pudieran estar implicados en los efectos de la 5-LO sobre la apoptosis. Entre ellos destacamos el factor de crecimiento endotelial vascular (379), la sobreestimulación de los PPAR α y γ (388), la interacción directa de la 5-LO con proteínas implicadas en la señalización intracelular y la organización del citoesqueleto (122,132) y por último, el incremento de los niveles intracelulares de AA libre (387). Aunque en teoría, las acciones proapoptóticas de los

inhibidores de la 5-LO puedan ser secundarias a efectos farmacológicos inespecíficos, el hecho de que se alcancen resultados comparables utilizando la inhibición génica de la 5-LO a través de la tecnología de oligonucleótidos antisense, descarta esta hipótesis (378,379). Por último, es importante destacar que los inhibidores de la FLAP también pueden actuar independientemente de su acción sobre la vía de la 5-LO ya que algunos inhibidores de la FLAP inducen apoptosis en células que carecen de actividad 5-LO (384). Sin embargo en nuestros experimentos los resultados obtenidos con el inhibidor selectivo de la 5-LO son muy similares a los obtenidos con el inhibidor de la FLAP lo que sugiere que en nuestras células, la inducción de apoptosis está ligada a la inhibición de la vía de la 5-LO.

La fibrosis hepática y en último término, la cirrosis hepática son una de las primeras causas de mortalidad dentro de las enfermedades del hígado. Ya que el proceso inflamatorio se encuentra virtualmente en todas las formas de fibrosis hepática, se han ido desarrollando una serie de estrategias terapéuticas antiinflamatorias para probar si así se puede revertir este proceso de remodelado tisular hepático. En este segundo estudio también hemos evaluado si el potente inhibidor selectivo de la FLAP tiene un efecto protector *in vivo* sobre la aparición de fibrosis hepática por inhalación de CCl₄ en la rata. Para realizar estos estudios *in vivo* escogimos utilizar el inhibidor de la FLAP Bay-X-1005 porque no sólo actúa sobre el lugar de unión de la FLAP sino que también inhibe la translocación de la 5-LO (339). El diseño del estudio se basó en nuestros resultados *in vitro* en los que observamos que la inhibición de la FLAP podría contribuir a la resolución de la inflamación a través de su efecto proapoptótico sobre los macrófagos tisulares hepáticos. Además, en nuestros experimentos se demostró que el Bay-X-1005 no inducía una apoptosis masiva de las células de Kupffer lo que sugería que *in vivo*, este compuesto podría reducir el número excesivo de células de Kupffer que se produce en las etapas

inflamatorias previas al desarrollo de fibrosis sin que por ello quedasen afectadas otras funciones vitales de estos macrófagos como son la defensa contra patógenos y la respuesta inmune. De hecho, cuando se administró el Bay-X-1005 a ratas tratadas con CCl₄ se demostró que este compuesto tenía un potente efecto antifibrótico y que era capaz de reducir el número de células de Kupffer en las ratas tratadas con el hepatotóxico (ver Anexo al artículo 2). Estos efectos beneficiosos de la inhibición de la 5-LO también se han observado en la hiperplasia experimental de la íntima (553). Además, hay que destacar que el ratón *knockout* para el gen de la 5-LO muestra estar protegido contra la fibrosis pulmonar causada por la bleomicina (266). De los resultados de este segundo trabajo no podemos determinar con exactitud hasta qué punto la protección contra la fibrosis hepática inducida por el Bay-X-1005 en ratas tratadas con CCl₄ es atribuible a la inactivación de las células de Kupffer o bien a la inhibición directa de la producción de LTs los cuales pueden tener múltiples acciones en el hígado, o bien es el resultado de ambos mecanismos.

En resumen, este segundo trabajo realizado para esta tesis doctoral proporciona la primera evidencia de que la presencia activa de la vía metabólica de la 5-LO es crítica para la supervivencia de las células de Kupffer. Además, este estudio proporciona la primera evidencia *in vivo* de que la vía de la 5-LO está implicada en la patogénesis de la fibrosis hepática. Conjuntamente, estos resultados demuestran que la inhibición de la vía de la 5-LO en las células de Kupffer puede reducir la progresión de la fibrosis durante el daño inflamatorio hepático crónico.

CONCLUSIONES

1. La expresión de la 5-LO y los niveles tisulares de cisteinil-LTs se encuentran aumentados en los hígados de las ratas tratadas con CCl₄ y fenobarbital.
2. Los hepatocitos aislados procedentes de ratas control y ratas cirróticas no expresan la 5-LO. De igual modo, la línea celular de hepatocitos de rata CC-1 no expresa la 5-LO ni en condiciones basales ni bajo estímulos como el LPS o la IL-6.
3. En el sinusoides hepático, la expresión de la 5-LO se encuentra restringida a las células de Kupffer. Además, son el único tipo celular hepático que expresa la maquinaria enzimática completa de la vía biosintética de la 5-LO: la 5-LO, su proteína activadora FLAP y la LTC₄ sintasa. La FLAP también se expresa de forma constitutiva en hepatocitos y HSC. La LTC₄ sintasa también se expresa en hepatocitos pero no en HSCs.
4. Los hepatocitos y las células CC-1 son capaces de sintetizar cisteinil-LTs a partir del intermediario LTA₄.
5. De entre los diferentes tipos celulares sinusoidales (hepatocitos, SECs, HSCs y células de Kupffer), los hepatocitos son las células hepáticas con mayor capacidad de síntesis de cisteinil-LTs a partir de LTA₄.
6. Los hepatocitos procedentes de ratas cirróticas producen mayores niveles de cisteinil-LTs derivados de fuentes endógenas que los hepatocitos procedentes de ratas control.
7. La capacidad para generar cisteinil-LTs a partir de LTA₄ es muy similar entre los hepatocitos procedentes de ratas cirróticas y los hepatocitos procedentes de ratas control.
8. El LPS y la IL-6 estimulan de forma dosis dependiente la producción de cisteinil-LTs a partir de LTA₄ en células CC-1.

9. El LTD₄ y el medio condicionado procedente de hepatocitos incubados con LTA₄ incrementan la [Ca²⁺]_i y la contracción de las HSCs. La preincubación de estas células con el antagonista MK-571 (antagonista del receptor Cys-LT₁) revierte los efectos del LTD₄ y del medio condicionado sobre las HSCs.
10. El LTD₄ posee actividad vasoconstrictora *in vivo* incrementando la MAP y la PP de ratas normovolémicas anestesiadas.
11. Las células de Kupffer en cultivo procedentes de ratas control producen cantidades similares de LTB₄ y cisteinil-LTs en cambio, no se detectan niveles significativos de 5-HETE en los sobrenadantes de estos cultivos.
12. Las células de Kupffer procedentes de ratas tratadas con CCl₄ producen mayores niveles de LTB₄ que de cisteinil-LTs.
13. Las células de Kupffer aisladas son capaces de proliferar *in vitro* después de 6 días en cultivo. La adición al medio de cultivo de M-CSF estimula el crecimiento de estos macrófagos de manera dosis-dependiente.
14. El inhibidor selectivo de la 5-LO AA861, y el inhibidor de la FLAP Bay-X-1005 reducen el número de células de Kupffer en cultivo.
15. Los inhibidores AA861 y Bay-X-1005 inhiben la proliferación de las células THP-1 de manera tiempo- y dosis-dependiente.
16. Los efectos antiproliferativos de los inhibidores AA861 y Bay-X-1005 se asocian a la inducción de apoptosis tanto en células de Kupffer como en la línea celular THP-1. Estos inhibidores inducen la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosomal del DNA (DNA *laddering*) y cambios en el ciclo celular (aumento de la fase sub-G₀/G₁).
17. La apoptosis inducida por los inhibidores AA861 y Bay-X-1005 en células THP-1 no se asocia al proceso de externalización de fosfatidilserina de la membrana celular.

18. El número de células de Kupffer está incrementado en los hígados procedentes de ratas tratadas con CCl₄ durante 6 semanas.
19. La administración oral de inhibidor Bay-X-1005 (100 mg/kg/día) a ratas tratadas con CCl₄ durante 6 semanas disminuye de forma significativa el número de células de Kupffer en el hígado de estos animales.
20. La administración oral de inhibidor Bay-X-1005 (100 mg/kg/día) a ratas tratadas con CCl₄ no sólo previene la aparición de necrosis hepatocelular al inicio del tratamiento con el hepatotóxico sino que además tiene efectos antifibróticos *in vivo* después de 8 semanas de tratamiento con CCl₄: reduce los índices histológicos de fibrosis y la concentración hepática de hidroxiprolina en estos animales.

APÉNDICE 1

APÉNDICE 1: Material y Métodos

En este apéndice metodológico me he limitado a definir aquellos protocolos no estandarizados y que quizás no quedan del todo detallados en los artículos.

1. Aislamiento de los distintos tipos celulares del hígado de la rata

El método utilizado para aislar las células hepáticas está basado en los métodos de perfusión *in situ* con colagenasa descritos por Berry y Friend (554) y Seglen (555).

Material y equipo:

Bomba peristáltica de perfusión Masterflex modelo 7518-00 (Cole Parmer), baño termostático y centrífuga refrigerada modelo 3K15 (Sigma Laborzentrifugen). Material de cirugía estéril: tijeras, pinzas (Aesculap) y seda trenzada 2/0 (Suturas Aragón). Filtros celulares de nylon de 100 μm , tubos de 50 ml de polipropileno y tubos de poliestireno de 15 ml (Falcon[®]). Filtros de jeringa y unidades de filtración Stericup de 0.22 μm (Millipore). Placas estériles de cultivo de 60 y 100 mm (Corning[®]). Cámaras de cultivo de 8 pocillos de plástico o *Lab-Tek[®] Chamber slide Permanox* (Nalge Nunc International). Hanks sin calcio ni magnesio (HBSS⁻), DPBS sin y con calcio y magnesio (DPBS⁻ y DPBS⁺⁺ respectivamente) (BioWhittaker), DPBS (10x) (Gibco[™]), HEPES (Merck), EGTA y albúmina sérica bovina (BSA, #A-4503) (Sigma), CaCl₂, DNAsa I y colagenasa A, (Roche). Percoll[™] (Amersham Biosciences).

Medios de perfusión y de aislamiento: durante el proceso de perfusión, digestión, escisión y troceamiento del hígado se utilizan 4 soluciones de HBSS⁻ distintas. Para facilitar el trabajo se elaboran primero las 2 soluciones madre que se especifican a continuación.

Soluciones madre:

Solución A: 10 mM HEPES + 1mM EGTA en HBSS⁻

Se prepara una solución A (200 ml) concentrada 10x:

4.76 g HEPES

0.76 g EGTA

Solución B: 10 mM HEPES + 2mM CaCl₂ en HBSS⁻

Se prepara una solución B (200 ml) concentrada 5x:

2.38 g HEPES

0.96 g CaCl₂ + 2H₂O

Medio 1 (300 ml): es la primera solución de perfusión y con ella eliminaremos la sangre del tejido y facilitaremos su posterior digestión:

30 ml solución A 10X

270 ml HBSS⁻

ajustar a pH 7.4 con NaOH y filtrar

Medio 2 (125 ml): 12.5 ml solución A 10X

112.5 ml HBSS⁻

0.625 g BSA (0.5% BSA)

ajustar a pH 7.4 y filtrar

Medio 3 (125 ml): 25 ml solución B 5X

100 ml HBSS⁻

0.625 g colagenasa (0.05%) *en el caso de hígados*

cirróticos se incrementa un 20% la cantidad de enzima

ajustar a pH 7.4 y filtrar

Medio 4 (100 ml): 20 ml solución B 5X
 80 ml HBSS⁻
 0.5 g BSA
 0.001 g DNasa
 ajustar a pH 7.4 y filtrar

Medio 5 (200 ml): 40 ml solución B 5X
 160 ml HBSS⁻
 2 g BSA (1% BSA)
 ajustar a pH 7.4 y filtrar

Preparación del gradiente de Percoll:

Soluciones de Percoll: mantener a 4°C hasta la preparación del gradiente

100% percoll: 90 ml percoll
 10 ml PBS 10X (con Ca²⁺ y Mg²⁺)

60% percoll: 60 ml percoll 100%
 40 ml PBS 1X (sin Ca²⁺ y Mg²⁺)

50% percoll: 30 ml percoll 100%
 30 ml PBS 1X (sin Ca²⁺ y Mg²⁺)

25% percoll: 20 ml percoll 100%
 30 ml PBS 1X (sin Ca²⁺ y Mg²⁺)

PROTOCOLO DE CIRUGÍA, PERFUSIÓN Y AISLAMIENTO:

Previamente a la cirugía se preparará el baño termostático a 38 °C y en él se colocan los medios 1, 2 y 3. La velocidad de la perfusión se establecerá a 14 ml/min.

1. El animal se anestesia con una inyección intramuscular de ketamina (50 mg/ kg de peso corporal).
2. Se coloca al animal sobre la mesa de operaciones y se fijan las extremidades.
3. Practicando una incisión con las tijeras en la zona inferior del abdomen seccionamos el abdomen longitudinalmente hasta llegar al tórax (con cuidado de no dañar el diafragma ni el hígado).
4. Con el objetivo de abrir bien la cavidad abdominal se realizan dos cortes transversales uno a la izquierda y otro a la derecha de la incisión longitudinal tanto en la porción superior cercana al tórax como en la porción inferior cercana a la vejiga.
5. Se coloca un tubo de 50 ml por debajo de la columna del animal con el objetivo de visualizar y controlar mejor la canulación de la porta.
6. Los intestinos se desplazan hacia la derecha de la cavidad abdominal con ayuda de palitos de algodón estériles.
7. Una vez localizada la vena porta se coloca un amago de nudo con hilo de sutura (2/0) por encima de la bifurcación de la vena mesentérica superior. Se practica otro nudo por debajo de la bifurcación cerrando así el flujo de sangre intestinal al hígado.
8. Se localiza la porción abdominal de la vena cava inferior (a nivel de los riñones) y se realiza un nuevo amago de nudo a este nivel tal como indica la *Figura 1.1*.
9. Se procede a la canulación de la porta: con una aguja de 23G se realiza una incisión en la porta y por ella se introduce el catéter de polietileno (0.58 mm ID, 0.96 mm OD) asociado al circuito de perfusión (*Figura 1.1*).
10. Fijar el catéter en la vena: el amago de nudo previamente colocado en la vena porta sujetará ahora de forma firme el catéter (realizar un doble nudo).
11. Introducir inmediatamente por esta vía 0.9 ml de heparina (1000 UI/ml) Empezar la perfusión con 10 minutos de perfusión no recirculante con el medio 1 de lavado.

IMPORTANTE: realizar una incisión con la aguja de 23G a nivel de la porción abdominal de la vena cava inferior. De esta manera se evitará que la presión del sistema aumente y acabe por dañar el hígado.

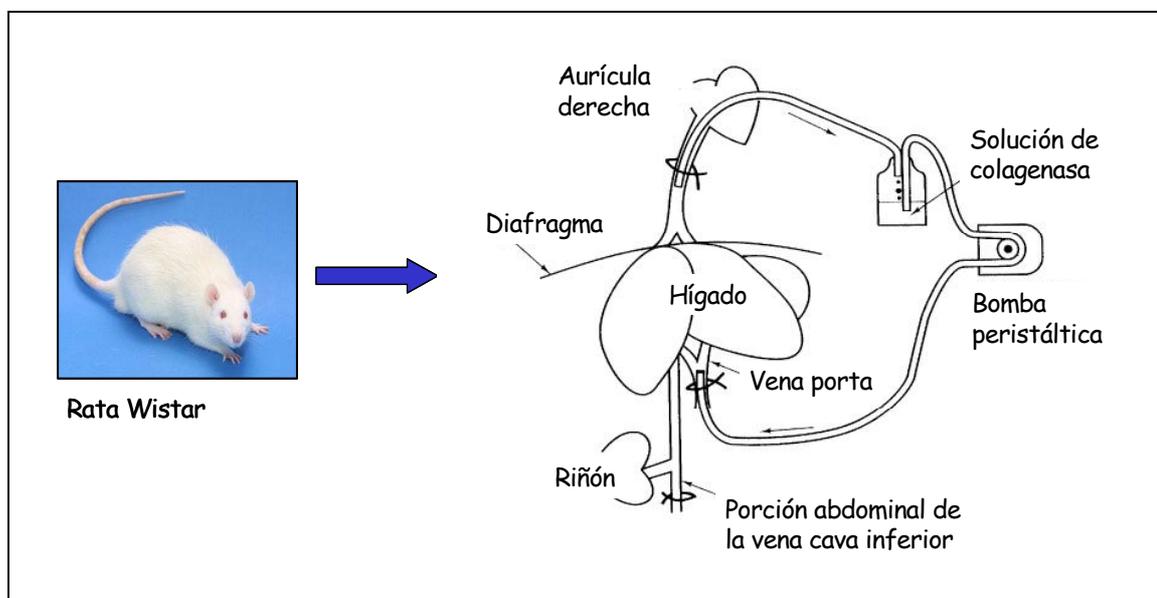


Figura 1.1. Las distintas soluciones de perfusión se encuentran en un baño a 38 °C y se perfunden al hígado mediante peristalsis a través de una cánula de entrada situada en la vena porta y una cánula de salida a nivel de la porción superior de la vena cava. El circuito permanece cerrado al cerrar la porción abdominal de la vena cava.

12. Inmediatamente abrir el tórax y colocar un nuevo catéter a través de la aurícula derecha en la porción torácica de la vena cava inferior. Fijar el catéter con un doble nudo.
13. Cerrar el sistema de perfusión a nivel de la porción abdominal de la vena cava inferior donde previamente habíamos colocado un amago de nudo (cerrar por encima de la incisión practicada con la aguja).
14. 5 min de perfusión no recirculante con el medio 2 (0.5% BSA).
15. 10-15 min de perfusión recirculante con el medio 3 (colagenasa).

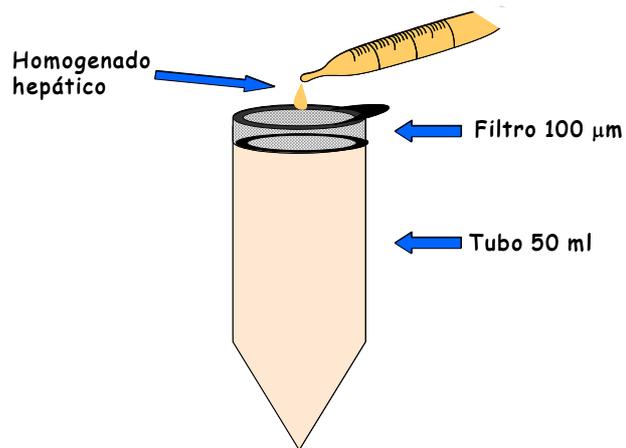


Figura 1.2. El homogenado hepático se filtra a través de mallas de nylon de 100 μm . Esta malla retiene la mayor parte de tejido no digerido y fibra dejando pasar células y restos celulares de digestión.

16. Se escinde el hígado de la cavidad abdominal (con cuidado de no perforar los intestinos) y se coloca en una placa de Petri con medio 4.
17. A partir de este punto todo el proceso se realizará en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar. El hígado se troceará con tijeras eliminando la red principal de vasos y la cápsula de Glisson.
18. El homogenado (medio 4) una vez troceado se colocará en un erlenmeyer estéril y se incubará en un baño termostático a 37 °C en agitación durante 10 min.
19. Filtrar el homogenado a través de una malla de nylon de 100 μm con ayuda de medio 5 frío. Para ello previamente se habrán preparado 4 tubos de 50 ml estériles en una caja con hielo. Los tubos se abrirán y en ellos se colocarán los filtros celulares de nylon de 100 μm estériles como especifica la *Figura 1.2*.
20. Rellenar los 4 tubos hasta 50 ml con medio 5 frío.
21. Centrifugar a 100 g (rotor basculante) a 4 °C y durante 5 min

PELLET: enriquecido en hepatocitos

SOBRENADANTE: enriquecido en células no parenquimales (NPC). Será el primer sobrenadante (NPC1) y se mantendrá a 4 °C hasta procesarlo.

22. PURIFICACIÓN DE HEPATOCITOS:

- 22.1. Resuspender el pellet de hepatocitos en DPBS⁻
- 22.2. Centrifugar a 100 g a 4°C, 5 min
- 22.3. Guardar este segundo sobrenadante enriquecido en NPC (NPC2)
- 22.4. Resuspender el pellet de hepatocitos en DPBS⁻
- 22.5. Centrifugar a 100 g a 4°C, 5 min
- 22.6. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 25 ml de DPBS
- 22.7. Depositar 2 ml de la suspensión celular sobre un cojín de 7.5 ml de percoll al 60% en tubos de 15 ml de poliestireno
- 22.8. Centrifugar a 400 g a 4°C, 10 min
- 22.9. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en DPBS⁻
- 22.10. Centrifugar a 100 g a 4°C, 5 min (x2)
- 22.11. Contar las células y cultivar en placas de Petri de plástico previamente cubiertas por colágeno R en medio E de Williams (ver composición en el apartado de medios de cultivo)(*)
- 22.12. Dejar en el incubador de CO₂ de 3 a 4 h. La mayoría de células se adhieren al colágeno.
- 22.13. Aspirar el medio de cultivo y lavar suavemente con DPBS⁺⁺ (x2)
- 22.14. Volver al añadir medio E de Williams fresco e incubar toda la noche en el incubador de CO₂.

NOTAS:

(*) Caracterización inmunocitológica. Una vez se ha hecho el recuento de hepatocitos se coge una pequeña muestra de aprox. 100.000 células y se somete a *cytospin* (500 g , 10 min) sobre portas de vidrio. Las preparaciones celulares se fijan durante 10 min en acetona fría (-20 °C), se dejan secar rápidamente a T^a ambiente y se guardan a -20 °C hasta la realización de la técnica de inmunocitología por el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic. Los marcadores utilizados son:

CD68: marcador de macrófagos (la glicoroteína macrosialina)

Cam 5,2: marcador de células epiteliales (citoqueratinas 8 y 18) ej.: hepatocitos

Vimentina: marcador de células mesenquimales (filamento intermedio), ej.: fibroblastos

α-actina: marcador de células musculares lisas (proteína del citoesqueleto)

CD31: marcador de células endoteliales (glicoproteína)

23. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS DE KUPFFER:

23.1. Centrifugar los sobrenadantes NPC1 y NPC2 a 100 g a 4°C, 5 min (x5). Estos 5 lavados del sobrenadante se realizan con el objetivo de eliminar los hepatocitos aún presentes por lo que cada vez el pellet resultante será eliminado.

23.5. Centrifugar los sobrenadantes de NPC a 800 g a 4 °C durante 10 min.

23.6. Descartar los sobrenadantes. Unificar todos los pellets celulares en un tubo de polipropileno de 50 ml.

23.7. Diluir el pellet de NPC en 40 ml de DPBS⁻ frío.

23.8. Preparar el gradient de Percoll: 50%/25% en 12 tubos de poliestireno de 15 ml: 1º: añadir 5 ml de percoll al 50%.

2º: añadir con cuidado y muy lentamente 6.6 ml de percoll al 25%.

3º: colocar sobre el percoll al 25%, 3.3 ml de NPCs.

23.9. Centrifugar a 800 g 25 min a 4 °C en una centrífuga bien balanceada de cabezales basculantes. Programar la aceleración y deceleración a 0.

23.10. Las células quedan distribuidas a través del gradiente tal y como se indica en la *Figura 1.3*.

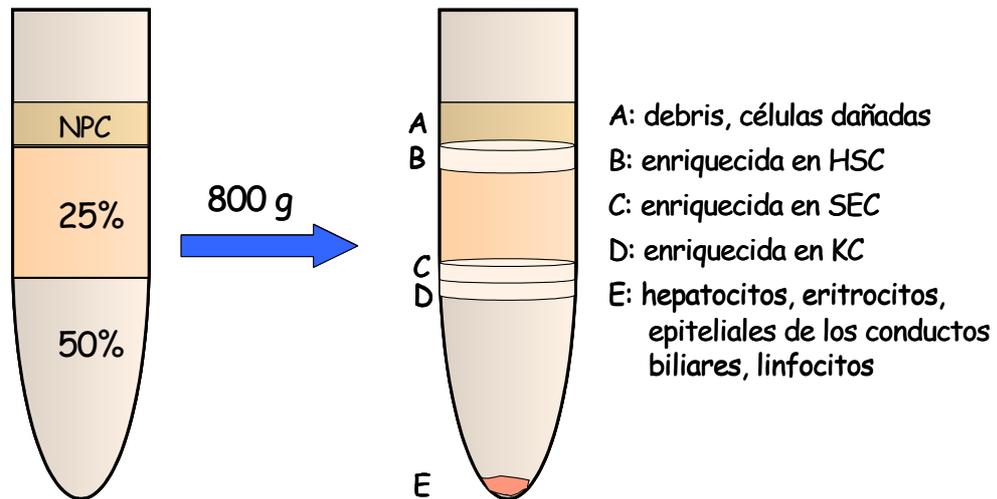


Figura 1.3. Los distintos tipos celulares no parenquimales se distribuyen a lo largo del gradiente: células hepáticas estrelladas (HSC), células sinusoidales endoteliales (SEC) y células de Kupffer (KC).

23.11. Aspirar con pipeta Pasteur de plástico estéril el anillo de HSC.

23.12. Recoger las fracciones celulares situadas en los anillos C y D esquematizados en la Figura 1.3 en 2 tubos de 50 ml. Debido a que la densidad celular de las SEC y las células de Kupffer es muy similar se recogen como un único anillo.

23.13. Añadir DPBS⁻ frío hasta 50 ml.

23.14. Centrifugar a 800 g 10 min a 4 °C.

23.15. Descartar el sobrenadante.

23.16. Resuspender el pellet en aprox. 6 ml de medio de cultivo RPMI 1640 sin FBS.

23.17. Contar las células con ayuda de la cámara de Neubauer. Obtendremos el número total de células (SEC+KC).

23.18. Cultivar las células sobre plástico en medio RPMI 1640 sin FBS durante 1h a 37 °C (*en el caso de células procedentes de hígados cirróticos incubar sólo 30 min*).

23.19. Observar el cultivo al microscopio óptico (200x). Después de esta incubación las células de Kupffer permanecen adheridas al plástico mientras que las células sinusoidales endoteliales y otros posibles tipos celulares flotan en el medio.

23.20. Lavar las placas con DPBS⁻ (x4) recogiendo el sobrenadante cada vez.

23.21. El cultivo de células de Kupffer se mantiene en medio RPMI 1640 suplementado tal y como se indica en el apartado de cultivos celulares.

23.22. Los sobrenadantes resultantes de los lavados de las placas se centrifugan a 800 g 10 min a T^a ambiente.

23.23. Descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet (SEC) en aprox. 2 ml y contar en número de células.

23.24. El número aproximado de células de Kupffer plaqueadas resulta de la resta al número total plaqueado (SEC+KC) del número de las células flotantes (SEC).

23.25. La caracterización de las células de Kupffer se ha de realizar de forma rutinaria en cada aislamiento mediante la tinción de la actividad esterasa no específica (o método del α -naftol) (Servicio de Hematopatología) y mediante el marcaje con el anticuerpo específico de macrófagos residentes ED-2. Más adelante se detallan los protocolos de marcaje directo e indirecto con el anticuerpo ED-2.

2. Cultivos celulares:

Condiciones de cultivo: 95% aire/5% CO₂, 37 °C y humedad saturante

2.1. Medios de cultivo:

Cultivo primario de hepatocitos de rata:

Medio E de Williams suplementado con

- 10% (v/v) suero bovino fetal inactivado(FCS)
- 2 mM L-Glutamina
- 50 UI/ml Penicilina/ 50 µg/ml Streptomicina
- 1 µM Insulina
- 15 mM HEPES

Cultivo primario de células de Kupffer de rata:

Medio RPMI 1640 suplementado con:

- 10% (v/v) FCS
- 2 mM L-Glutamina
- 50 UI/ml Penicilina/ 50 µg/ml Streptomicina

Cultivo de la línea celular de hepatocitos de rata CC-1:

Medio mínimo esencial Eagle (EMEM) suplementado con:

- 10% (v/v) FCS
- 2 mM L-Glutamina
- 1% Aminoácidos no esenciales
- 20 mM HEPES

Cultivo de la línea celular de macrófagos pulmonares de rata CRL-2192:

Medio RPMI 1640 suplementado con:

- 15% (v/v) FCS
- 2 mM L-Glutamina
- 50 UI/ml Penicilina/ 50 µg/ml Streptomicina

Cultivo de la línea celular de monocitos humanos THP-1:

Medio RPMI 1640 suplementado con:

10% (v/v) FCS

2 mM L-Glutamina

100 UI/ml Penicilina/ 100 µg/ml Streptomicina

2.2. Contaje de células viables

La viabilidad celular se determina mediante la tinción con azul tripán de la suspensión celular y el recuento de células mediante la utilización de una cámara Neubauer (*Figura 1.4*) y posterior visualización al microscopio óptico.

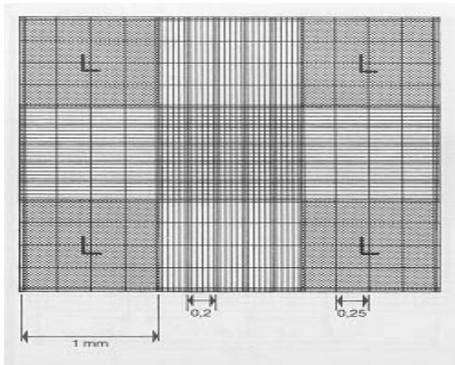


Figura 1.4. Visualización al microscopio óptico de las áreas de contaje (L) de la cámara Neubauer.

1. Preparar en un tubo eppendorf de 1.5 ml: 10 µl de azul tripán 0.5 % (Serva) + 180 µl de una solución de DPBS⁺⁺ que contiene 0.5 % de ácido acético + 0.9 % de salino).
2. Añadir 10 µl de la suspensión celular (la dilución será 1/20) y mezclar.
3. Esperar 5-10 min.
4. Transferir 10 µl a la cámara de Neubauer
5. Contar todas las células que se encuentran dentro de las 4 áreas L (figura) al microscopio. Obtener una media del nº de células por área (dividir el total por 4).

Cálculos:

Células/ml = nº de células por área L X factor de dilución (1/20) X 10⁴

Células totales = células/ml X volumen original de la suspensión celular (ml)

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células viables (no teñidas de azul)}}{\text{n}^\circ \text{ de células viables} + \text{n}^\circ \text{ de células no viables}} \times 100$$

2.3. Preparación de las placas de cultivo de plástico cubiertas de colágeno

1. Preparar en condiciones estériles 30 ml de colágeno R (Serva) al 0.03% en DPBS⁺⁺.
2. Bajo campana de flujo laminar abrir las placas de cultivo y añadir:
2 ml de colágeno R 0.03% a P-60 o bien 3 ml a P-100. Asegurar que toda la superficie de plástico queda recubierta por la solución de colágeno.
3. Dejar incubar a 37 °C durante 1 h.
4. Recoger el colágeno (se puede reaprovechar una vez más) y añadir DPBS⁺⁺ a la placa de cultivo para evitar que se seque antes de poder utilizarla. Si no se va a utilizar inmediatamente guardar a 4 °C.

3. Técnicas de inmunocitoquímica, inmunohistología y otras tinciones celulares

Material:

Cámaras de cultivo de plástico de 8 pocillos (*Lab-Tek*[®] *Chamber slide Permanox* (Nalge Nunc International). DPBS⁺⁺ (Biowitaker). Portas cubiertos de poli-L-Lisina, BSA (#A-7906), Ioduro de propidio, peróxido de hidrógeno y tripsina tipo II-S (Sigma). RNasa A (Roche). Mowiol (medio de montaje para fluorescencia) (Calbiochem). Anexina V-FITC (Bender MedSystems). Anticuerpo ED-2 (IgG de ratón anti-rata. Reconoce específicamente un antígeno de membrana presente en las células de Kupffer): RPE-ED-2 (#MCA342PE, conjugado con la ficoeritrina, utilizado en la inmunofluorescencia directa) y ED-2 (#MCA342R, utilizado en el marcaje indirecto) (Serotec). Xileno y etanol

(Panreac). “Mouse IgG” Vectastain[®] Elite ABC kit, Blocking Kit (soluciones de Avidina D y biotina), DAB substrate kit for peroxidase y Vectamount (Vector Laboratories).

3.1. Inmunofluorescencia directa con el anticuerpo ED-2 de células de Kupffer

1. Mantener en cultivo las células de Kupffer recién aisladas en portas de plástico de 8 pocillos (8 *well-Permanox slides*) durante toda la noche.
2. Lavar la cámara de cultivo durante 5 min con DPBS⁻ (x2).
3. Fijar las células en acetona fría (-20 °C) durante 10 min.
4. Añadir un 1% BSA en DPBS⁺⁺ e incubar durante 30 min a T^a ambiente.
5. Aspirar con cuidado.
6. Añadir el anticuerpo ED-2 diluido (RPE-ED-2: 1/25 en un 1% BSA en DPBS⁺⁺) e incubar durante toda la noche a 4 °C.
7. Lavar la cámara de cultivo o porta durante 5 min con un 1% BSA en DPBS⁺⁺ (x2).
8. Añadir 5 µl de medio de montaje (Mowiol) y colocar el cubre de vidrio sobre la preparación.
9. Visualización en un microscopio confocal o de fluorescencia

Fluorocromo: R-ficoeritrina (PE)

excitación (nm): 480, 565

emisión (nm): 578 (naranja, rojo)

3.2. Inmunohistoquímica con el anticuerpo ED-2 de muestras de tejido parafinadas (*).

1. Colocar los bloques de parafina 10 min en hielo antes de realizar las secciones al micrótopo(**).

2. Recortar el bloque de parafina con un micrótopo a 50 μm hasta que el tejido se haga accesible.
3. Realizar los cortes a 5 μm .
4. Recoger las tiras de parafina y con cuidado dejarlas sobre la superficie de H_2O destilada previamente calentada a 38-40 $^\circ\text{C}$. Se mantienen en el baño termostático 15 min, hasta que las tiras de parafina se han estirado y no aparecen arrugas.
5. Rescatar las secciones capturándolas sobre un porta de poli-L-Lisina. Eliminar el H_2O por capilaridad con un poco de papel.
6. Incubar los portas toda la noche (o 2-4 h) en una estufa a 37 $^\circ\text{C}$.

I. Desparafinar e hidratar

7. Sumergir los portas en xileno durante 5 min (x2).
8. Hidratar las muestras sumergiéndolas primero en etanol al 100 % durante 5 min (x2), etanol al 95 % durante 3 min (x2) y por último en etanol al 70 % durante 3 min (x2).
9. Sumergir los portas en H_2O corriente durante 3 min.

II. Desenmascarar en antígeno por proteólisis con tripsina al 0.1 %

10. Preparar la tripsina en H_2O destilada (100 ml):

0.1 g de CaCl_2

0.1 g tripsina

ajustar pH a 7.8 con NaOH

11. Calentar la solución de tripsina a 37 $^\circ\text{C}$.
12. Colocar unas gotas de tripsina al 0.1 % sobre las secciones histológicas e incubar durante 15 min a 37 $^\circ\text{C}$.
13. Lavar con TBS (Tris-Cl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5) 5 min (x1).

III. Eliminar la actividad peroxidasa endógena (“quenching”)

14. Colocar unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % (en H₂O) e incubar durante 10 min a T^a ambiente.

15. Lavar los portas en TBS durante 5 min (x2).

IV. Bloqueo

16. Incubar las secciones durante 30 min con el suero normal diluido (SN) que ha de proceder de la especie donde se generó el anticuerpo secundario. En este caso el suero es de caballo y ya viene suministrado por el kit de marcaje de Vectastain[®] Elite ABC kit. Para el marcaje con ED-2 añadir un 2 % de BSA al NS.

17. Eliminar el exceso de solución de bloqueo de las secciones histológicas.

18. Añadir unas gotas de la solución de bloqueo de Avidina D que contiene el kit de bloqueo. Incubar durante 15 min a T^a ambiente.

19. Lavar con TBS x1.

20. Incubar durante 15 min con la solución de bloqueo de biotina.

21. Lavar con TBS x1.

*V. Anticuerpo primario(***)*

22. Incubar las secciones con el anticuerpo monoclonal ED-2 diluido 1/200 en TBS durante toda la noche a 4 °C.

23. Lavar las preparaciones durante 5 min con TBS (x2).

VI. Anticuerpo secundario

24. Incubar las preparaciones durante 30 min con el anticuerpo secundario biotinilado previamente diluido (incluido en el kit de marcaje).

25. Lavar las preparaciones durante 5 min en TBS (x2).

VII. Complejo Avidina-biotina-peroxidasa

26. Incubar las preparaciones durante 30 min con el complejo avidina-biotina ligado a la peroxidasa que suministra el kit (Vectastain[®] Elite ABC Reagent).

27. Lavar las preparaciones durante 5 min en TBS (x2).

VIII. Reacción cromogénica

28. Incubar las secciones histológicas durante 5 min con la solución que contiene el sustrato de la peroxidasa, la 3, 3'-diaminobencidina (DAB). Esta solución se prepara siguiendo las instrucciones del kit "DAB substrate kit for peroxidase".

29. Parar la reacción sumergiendo los portas en H₂O corriente durante 5 min.

IX. Contraste con hematoxilina

30. Sumergir las preparaciones en Hematoxilina de Meyer durante 5 min.

31. Lavar las preparaciones en H₂O corriente durante 5 min.

X. Deshidratación, aclaramiento y montaje

32. Deshidratar sumergiendo los portas sucesivamente en etanol al 70 %, 80 %, 95 % y 100 % durante 1 min cada uno.

33. Sumergir los portas en xileno durante 5 min (x4).

34. Montar el cubre con unas gotas de Vectamount. Dejar que se seque.

XI. Observación al microscopio óptico

35. Las células positivas quedan macadas intensamente de color marrón oscuro.

36. Análisis cuantitativo: en cada tejido se cuenta el número de células positivas en un total de 25 campos de alta resolución o *high-power fields* (HPFs) que es aquella área que se observa al microscopio a 400 aumentos. Expresar el resultado como número de células positivas/HPF.

NOTAS:

(*): el marcaje de preparaciones celulares sigue el mismo protocolo a excepción de:

1. Fijar en acetona fría (-20 °C) durante 10 min. Lavar 5 min en TBS. Realizar el "quenching".
2. No se requiere de la digestión con tripsina.

(**): la inclusión del tejido hepático en parafina se lleva a cabo de forma rutinaria en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic.

(***): el control negativo no se incubaba con anticuerpo primario sino con TBS.

3.3. Tinción con yoduro de propidio (IP)

1. Preparar las soluciones madre de IP y RNasa A en H₂O destilada

IP: 50 µg/ml (solución madre)

RNasa A: 10 mg/ml

2. Aspirar el medio de cultivo y lavar las células adheridas al porta con DPBS⁻ (x2).

3. Añadir formaldehído al 3 % en DPBS⁻. Incubar a T^a ambiente durante 20 min.

4. Aspirar la solución de fijación y añadir metanol al 100 % frío (-20 °C) para permeabilizar las células. Incubar durante 20 min a T^a ambiente.

5. Aspirar el metanol y lavar con DPBS⁻ (x3).

6. Añadir IP (0.05 µg/µl) con RNasa A (200 µg/µl) en DPBS⁻. Incubar a T^a ambiente durante 10 min. Proteger de la luz a partir de este momento.

7. No es necesario realizar lavados.

8. Montar la preparación en medio Mowiol.

9. Visualizar al microscopio de fluorescencia.

absorción en azul-verde (nm): 493

emisión en rojo (nm): 630 nm

NOTAS:

a. El IP es un intercalador de DNA con un alto potencial cancerígeno y por lo tanto debe manipularse con la precaución descrita para este tipo de compuestos.

b. Las células no adherentes (≈300.000 células) se fijan en portas de vidrio mediante *cytopins*.

3.4. Análisis del contenido celular de DNA por citometría de flujo (FACS)

1. Recoger las células de las placas de cultivo (en caso tener células que crecen adheridas al plástico tripsinizar previamente) en tubos de 15 ml.
2. Centrifugar a 900 g durante 5 min a 4 °C.
3. Aspirar el sobrenadante y añadir 4 ml de DPBS⁺⁺-FBS 1 %.
4. Centrifugar a 900 g durante 5 min a 4 °C.
5. Aspirar con cuidado el sobrenadante.
6. Añadir 1 ml de etanol al 80% frío (-20 °C) e incubar a esta T^a durante 5 min (proceso de fijación, resuspender bien el pellet de células).
7. Añadir 3 ml de DPBS⁺⁺-FBS 1 %.
8. Centrifugar a 900 g durante 5 min a 4 °C.
9. Aspirar con cuidado el sobrenadante.
10. Añadir 2 ml de DPBS⁺⁺-FBS 1 % (resuspender bien).
11. Centrifugar a 900 g durante 5 min a 4 °C.
12. Aspirar con cuidado el sobrenadante.
13. Añadir 500 µl de DPBS⁺⁺-FBS 1 % (resuspender bien).
14. Añadir 50 µl de tampón citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 0.2 M, ácido cítrico 0.1 M, en proporción 96:4) con 200 µg/ml de yoduro de propidio y 10 mg/ml de RNAsa A sin DNAsas.
15. Incubar durante 10 min a T^a ambiente y protegido de la luz.
16. Guardar a 4 °C y protegido de la luz hasta el momento del análisis por FACS.

3.5. Detección de apoptosis por la unión a Anexina V-FITC mediante citometría de flujo

1. Preparar 500 ml de la solución tamponada (*binding buffer*) necesaria para la unión de la Anexina V a la fosfatidilserina: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, ajustar a pH 7.4.
2. Recoger las células en tubos de 15 ml.
3. Centrifugar a 2000 g, 5 min.
4. Resuspender las células en 10 ml de tampón de unión. Centrifugar a 2000 g, 5 min. Repetir este paso una vez más.
5. Aspirar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 200 µl de tampón. Coger 10 µl y contar las células (ajustar la densidad celular a 2-5 x 10⁵ células/ml).
7. Añadir 1 µl de anexina V-FITC. Resuspender bien e incubar las muestras durante 15 min protegidas de la luz.
8. Añadir 10 ml de tampón. Centrifugar a 2000 g, 5 min.
9. Resuspender en 195 µl de tampón.
10. Si las muestras no pueden ser analizadas de inmediato pueden guardarse a 4 °C durante un máximo de 24 h.
11. Añadir 10 µl de yoduro de propidio (20 µg/ml)
12. Análisis por FACS.

4. Otros métodos:

4.1. Incubación celular con los substratos de la síntesis de LTs, AA y LTA₄

1. Preparar el AA o el LTA₄(*):

Ácido araquidónico:

100 µg/µl, #90010 Cayman Chemical

PM: 304.5 g/mol

2. Diluir 1/10 en etanol al 100 % (10 µg/µl) en un vial de vidrio. Cerrar el vial bajo una atmósfera de nitrógeno. Guardar a -20 °C. Esta es la solución de trabajo.
3. Las células se resuspenden en DPBS⁺⁺. Añadir 20 µM de AA o 15 µM de LTA₄ previamente hidrolizado (ver protocolo de hidrólisis).
4. Añadir 5 µM de ionóforo de Ca²⁺ (A23187 Sigma).
5. Incubar las células durante 20 min a 37 °C.
6. Parar la reacción y precipitar las proteínas añadiendo 2 volúmenes de metanol frío.
7. Guardar a -20 °C hasta su posterior análisis.

NOTAS:

(*):El LTA₄ libre es un compuesto muy inestable por lo que se comercializa metilado mediante un enlace éster. Así, previamente a su utilización en ensayos celulares se ha de realizar la hidrólisis del grupo metilo. Este protocolo viene detallado a continuación.

4.2. Hidrólisis del LTA₄- metil éster

Leukotriene A4 methyl ester (#20010 Cayman Chemical):

25 µg en 250 µl de hexano/1% TEA

PM= 332.5 g/mol

1. Evaporar la solución de hexano/1% TEA del vial de LTA₄-metil éster bajo nitrógeno hasta que el vial esté completamente seco.
2. Resuspender el extracto seco en 500 µl de tetrahidrofurano y mantenerlo a 4 °C.
3. Previamente preparar en un recipiente de plástico un baño de isopropanol con nieve carbónica y dejar en agitación a 4 °C con la ayuda de un agitador magnético (ver *Figura 1.5*)

4. Pasar los 500 μl de tetrahidrofurano (THF) a un nuevo vial de vidrio con un pequeño imán como indica la *Figura 1.5* y dejar que se agite.
5. Añadir al vial 50 μl de LiOH 1 M mientras se agita.
6. Añadir 5 μl de H₂O destilada.
7. Dejar agitar durante 24 h a 4 °C.
8. Evaporar la solución de hidrólisis bajo una atmósfera de nitrógeno.
9. Resuspender el extracto seco en 200 μl de metanol y guardar a -80°C hasta su posterior utilización.

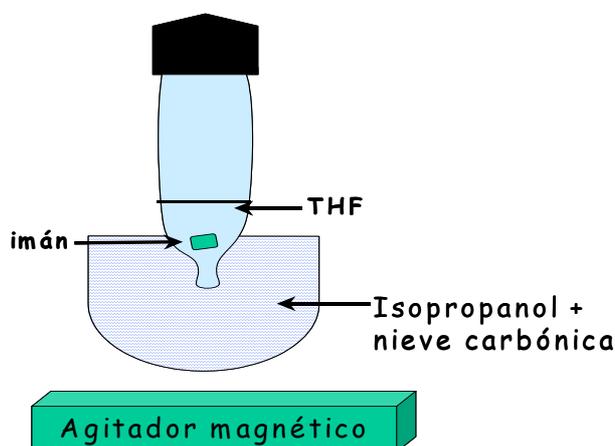


Figura 1.5. El LTA₄ pierde el grupo metilo cuando se incuba 24 h en una solución de THF que contiene LiOH.

10. Coger una alícuota de esta solución disolver en 1 ml de metanol y chequear la estabilidad del LTA₄ mediante la determinación del espectro de absorción ultravioleta (medir el espectro desde 200 a 350 nm). Típicamente los compuestos con 3 dobles enlaces conjugados dan lugar a un característico triplete de absorción UV con un primer pico alrededor de los 260 nm, un máximo a sobre los 280 nm y un último pico alrededor de los 300 nm (*Figura 1.6*).

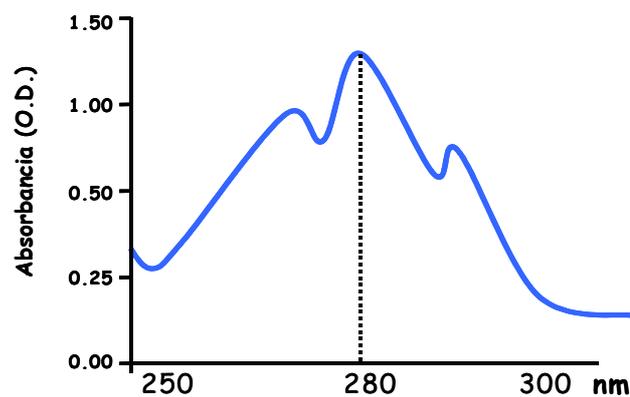


Figura 1.6. Típico espectro de absorción del LTA₄.

4.3. Características de los oligonucleótidos y condiciones de amplificación por RT-PCR de los genes 5-LO, FLAP, LTC₄ sintasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de rata.

Reacción de retrotranscripción (RT):

para un volumen de 20 µl:

2 µg RNA total

4 µl AMV RT 5x *Reaction Buffer* (#M515A, Promega)

2 µl dNTPs 10 mM

0.5 µl *Rnase inhibitor* 40 u/µl

1 µl *Random primers* u Oligo dT₁₅ (500 µg/ml)

1.5 µl AMV *Reverse Transcriptase* (#M5101, Promega)

x µl H₂O libre de nucleasas

reacción: 42°C 45 min

guardar a 4°C

Tabla 1.1. Condiciones de la RT-PCR para los genes de rata estudiados: en todas las amplificaciones se utilizó el *kit* de amplificación de Invitrogen: *Taq DNA Polymerase*, (#18038-026).

<u>GEN</u> <i>GenBank database</i>	<u>PRIMER SENSE</u>	<u>PRIMER ANTISENSE</u>	<u>Condiciones de PCR</u>
5-LO <i>Nº. J03960</i>	Nucleótidos 152-173 5'-tacattacctcagcctcattg-3'	Nucleótidos 598-619 5'-gtccactccctttcactatca-3'	4 µl RT, no MgCl ₂ (94°C 30'', 58°C 1', 72°C 30'') x35 ciclos 468 pb
FLAP <i>Nº. X52196</i>	Nucleótidos 289-310 5'-gggctgatgtatctgttcgtg-3'	Nucleótidos 479-499 5'-gcggggagatcgtcgtggta-3'	2 µl RT, 0.5 mM MgCl ₂ (96°C 30'', 55°C 30'', 75°C 45'') x35 ciclos 211 pb
LTC ₄ sintasa <i>Nº. AB048790</i>	Nucleótidos 167-184 5'-ccgagttcgagcgcgtct-3'	Nucleótidos 290-307 5'-tctacctgttcgcgcgc-3'	3 µl RT, 1.5 mM MgCl ₂ (96°C 45'', 60°C 30'', 72°C 1') x35 ciclos 141 pb
GAPDH <i>Nº. X02231</i>	Nucleótidos 451-470 5'-tcctcaagattgtcagcaa-3'	Nucleótidos 739-758 5'-agatecacaacggatacatt-3'	2 µl RT, 1 mM MgCl ₂ (94°C 30'', 58°C 1', 72°C 30'') x35 ciclos 309 pb

APÉNDICE 2

APÉNDICE 2: Publicaciones derivadas de este trabajo

1. **Titos E.**, Chiang N., Serhan C.N., Romano M., Gaya J., Pueyo G and Clària J. Hepatocytes are a rich source of novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)* 1999; 277:C870-C877.
2. **Titos E.**, Chiang N., Serhan C.N., Romano M., Gaya J., Pueyo G., Clària J. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ biosynthesis in rat liver cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002;507:199-209.
3. **Titos E.**, Planagumà A., López-Parra M., Villamor N., Miquel R., Jiménez W., Arroyo V., Rivera F., Rodés J. and Clària J. 5-Lipoxygenase (5-LO) is involved in Kupffer cell survival. Possible role of 5-LO products in the pathogenesis of liver fibrosis. *Comp. Hepatol.* 2004; 14; Suppl 1:S19.
4. Clària J., **Titos E.** La célula de Kupffer. *Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 27: 264-273.

BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy RC. Biosynthesis and Metabolism. In: Watkins WD, Peterson MB, and Fletcher JR, eds. Prostaglandins in Clinical Practice. New York: Raven Press, 1989:1-20.
2. Balsinde J, Winstead MV, Dennis EA. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 2002;531:2-6.
3. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994;269:13057-13060.
4. Irvine RF. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem J* 1982;204:3-16.
5. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999;274:23679-23682.
6. Ford-Hutchinson AW. Arachidonate 15-lipoxygenase; characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids* 1991;4:65-74.
7. Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999;449:7-11.
8. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987;237:1171-1176.
9. Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996;10:1147-1158.
10. Claria J, Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9475-9479.
11. Badr KF, DeBoer DK, Schwartzberg M, Serhan CN. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3438-3442.
12. Yoshimoto T, Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:245-62.:245-262.
13. Takahashi Y, Kawajiri H, Yoshimoto T, Hoshi N, Higashida H. 12-Lipoxygenase overexpression in rodent NG108-15 cells enhances membrane excitability by inhibiting M-type K⁺ channels. *J Physiol* 1999;521 Pt 3:567-74.:567-574.
14. Schafer AI. Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 1982;306:381-386.
15. George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2001;104:1646-1650.
16. Sakashita T, Takahashi Y, Kinoshita T, Yoshimoto T. Essential involvement of 12-lipoxygenase in regiospecific and stereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *Eur J Biochem* 1999;265:825-831.

17. Gao X, Porter AT, Honn KV. Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997;407:41-53.:41-53.
18. Nigam S, Kumar GS, Sutherland M, Schewe T, Ikawa H, Yamasaki Y, Ueda N, Yamamoto S. Metabolic suppression of platelet-type 12-lipoxygenase in human uterine cervix with invasive carcinoma. *Int J Cancer* 1999;82:827-831.
19. Gonzalez-Nunez D, Claria J, Rivera F, Poch E. Increased levels of 12(S)-HETE in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2001;37:334-338.
20. Boeglin WE, Kim RB, Brash AR. A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6744-6749.
21. Nadel JA, Conrad DJ, Ueki IF, Schuster A, Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest* 1991;87:1139-1145.
22. Sigal E, Grunberger D, Highland E, Gross C, Dixon RA, Craik CS. Expression of cloned human reticulocyte 15-lipoxygenase and immunological evidence that 15-lipoxygenases of different cell types are related. *J Biol Chem* 1990;265:5113-5120.
23. Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene *Alox15*. *Science* 2004;303:229-232.
24. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6148-6152.
25. Goetzl EJ, Sun FF. Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils. *J Exp Med* 1979;150:406-411.
26. Zeng ZZ, Yellaturu CR, Neeli I, Rao GN. 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. *J Biol Chem* 2002;277:41213-41219.
27. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990;323:645-655.
28. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983;220:568-575.
29. Funk CD, Hoshiko S, Matsumoto T, Rdmak O, Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2587-2591.
30. In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, Silverman ES, Collins T, Fischer AR, Keith TP, Serino K, Kim SW, De Sanctis GT, Yandava C, Pillari A, Rubin P, Kemp J, Israel E, Busse W, Ledford D, Murray JJ, Segal A, Tinkleman D, Drazen JM. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 1997;99:1130-1137.

31. Silverman ES, Du J, De Sanctis GT, Radmark O, Samuelsson B, Drazen JM, Collins T. Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:316-323.
32. Silverman E, In KH, Yandava C, Drazen JM. Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase pathway in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28 Suppl 5:164-70; discussion 171-3.:164-170.
33. Drazen JM, Yandava CN, Dube L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, Israel E, Schork N, Silverman ES, Katz DA, Drajesk J. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999;22:168-170.
34. Radmark O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:211-34.
35. Uhl J, Klan N, Rose M, Entian KD, Werz O, Steinhilber D. The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem* 2002;277:4374-4379.
36. Janssen-Timmen U, Vickers PJ, Wittig U, Lehmann WD, Stark HJ, Fusenig NE, Rosenbach T, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6966-6970.
37. Spanbroek R, Stark HJ, Janssen-Timmen U, Kraft S, Hildner M, Andl T, Bosch FX, Fusenig NE, Bieber T, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:663-668.
38. Lammers CH, Schweitzer P, Facchinetti P, Arrang JM, Madamba SG, Siggins GR, Piomelli D. Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. *J Neurochem* 1996;66:147-152.
39. Rouzer CA, Shimizu T, Samuelsson B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: characterization of a membrane-associated stimulatory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7505-7509.
40. Shimizu T, Radmark O, Samuelsson B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:689-693.
41. Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 1993;215:105-111.
42. Hill E, Maclouf J, Murphy RC, Henson PM. Reversible membrane association of neutrophil 5-lipoxygenase is accompanied by retention of activity and a change in substrate specificity. *J Biol Chem* 1992;267:22048-22053.
43. Wiseman JS, Skoog MT, Nichols JS, Harrison BL. Kinetics of leukotriene A4 synthesis by 5-lipoxygenase from rat polymorphonuclear leukocytes. *Biochemistry* 1987;26:5684-5689.
44. Bach MK, Brashler JR. In vivo and in vitro production of a slow reacting substance in the rat upon treatment with calcium ionophores. *J Immunol* 1974;113:2040-2044.

45. Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:2148-2152.
46. Noguchi M, Miyano M, Matsumoto T, Noma M. Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA₄ synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* 1994;1215:300-306.
47. Percival MD, Denis D, Riendeau D, Gresser MJ. Investigation of the mechanism of non-turnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase. Inactivation by H₂O₂ and inhibition by metal ions. *Eur J Biochem* 1992;210:109-117.
48. Puustinen T, Scheffer MM, Samuelsson B. Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1988;960:261-267.
49. Schatz-Munding M, Hatzelmann A, Ullrich V. The involvement of extracellular calcium in the formation of 5-lipoxygenase metabolites by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 1991;197:487-493.
50. Hammarberg T, Radmark O. 5-lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry* 1999;38:4441-4447.
51. Rouzer CA, Samuelsson B. Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7393-7397.
52. Rouzer CA, Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 1988;263:10980-10988.
53. Wong A, Hwang SM, Cook MN, Hogaboom GK, Crooke ST. Interactions of 5-lipoxygenase with membranes: studies on the association of soluble enzyme with membranes and alterations in enzyme activity. *Biochemistry* 1988;27:6763-6769.
54. Hammarberg T, Provost P, Persson B, Radmark O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 2000;275:38787-38793.
55. Burkert E, Szellas D, Radmark O, Steinhilber D, Werz O. Cell type-dependent activation of 5-lipoxygenase by arachidonic acid. *J Leukoc Biol* 2003;73:191-200.
56. Surette ME, Krump E, Picard S, Borgeat P. Activation of leukotriene synthesis in human neutrophils by exogenous arachidonic acid: inhibition by adenosine A_{2a} receptor agonists and crucial role of autocrine activation by leukotriene B₄. *Mol Pharmacol* 1999;56:1055-1062.
57. Wong A, Cook MN, Hwang SM, Sarau HM, Foley JJ, Crooke ST. Stimulation of leukotriene production and membrane translocation of 5-lipoxygenase by cross-linking of the IgE receptors in RBL-2H3 cells. *Biochemistry* 1992;31:4046-4053.
58. Reddy KV, Hammarberg T, Radmark O. Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry* 2000;39:1840-1848.
59. Falgout JP, Denis D, Macdonald D, Hutchinson JH, Riendeau D. Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling and enzyme immobilization. *Biochemistry* 1995;34:13603-13611.

60. Noguchi M, Miyano M, Matsumoto T. Physicochemical characterization of ATP binding to human 5-lipoxygenase. *Lipids* 1996;31:367-371.
61. Ochi K, Yoshimoto T, Yamamoto S, Taniguchi K, Miyamoto T. Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 1983;258:5754-5758.
62. Aharony D, Stein RL. Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 1986;261:11512-11519.
63. Skorey KI, Gresser MJ. Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidyl choline vesicle concentrations. *Biochemistry* 1998;37:8027-8034.
64. Riendeau D, Falguyret JP, Meisner D, Sherman MM, Laliberte F, Street IP. Interfacial catalysis and production of a high ratio of leukotriene A4 to 5-HPETE by 5-lipoxygenase in a coupled assay with phospholipase A2. *J Lipid Mediat* 1993;6:23-30.
65. Rouzer CA, Samuelsson B. The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. *FEBS Lett* 1986;204:293-296.
66. Ueda N, Kaneko S, Yoshimoto T, Yamamoto S. Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem* 1986;261:7982-7988.
67. Zhang YY, Hamberg M, Radmark O, Samuelsson B. Stabilization of purified human 5-lipoxygenase with glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Anal Biochem* 1994;220:28-35.
68. Rouzer CA, Samuelsson B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6040-6044.
69. Denis D, Falguyret JP, Riendeau D, Abramovitz M. Characterization of the activity of purified recombinant human 5-lipoxygenase in the absence and presence of leukocyte factors. *J Biol Chem* 1991;266:5072-5079.
70. Miller DK, Gillard JW, Vickers PJ, Sadowski S, Leveille C, Mancini JA, Charleson P, Dixon RA, Ford-Hutchinson AW, Fortin R, . Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 1990;343:278-281.
71. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990;343:282-284.
72. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7663-7667.
73. Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, Mancini JA, Leveille C, Ethier D, Miller DK, Gillard JW, Dixon RA, Evans JF. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J Biol Chem* 1990;265:19818-19823.
74. Vickers PJ. 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:185-194.

75. Pouliot M, McDonald PP, Borgeat P, McColl SR. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J Exp Med* 1994;179:1225-1232.
76. Riddick CA, Ring WL, Baker JR, Hodulik CR, Bigby TD. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. *Eur J Biochem* 1997;246:112-118.
77. Ring WL, Riddick CA, Baker JR, Munafo DA, Bigby TD. Lymphocytes stimulate expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in monocytes in vitro via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. *J Clin Invest* 1996;97:1293-1301.
78. Cowburn AS, Holgate ST, Sampson AP. IL-5 increases expression of 5-lipoxygenase-activating protein and translocates 5-lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils. *J Immunol* 1999;163:456-465.
79. Claesson HE, Jakobsson PJ, Steinhilber D, Odlander B, Samuelsson B. Expression of 5-lipoxygenase and biosynthesis of leukotriene B4 in human mononuclear leukocytes. *J Lipid Mediat* 1993;6:15-22.
80. Kargman S, Rousseau P, Reid GK, Rouzer CA, Mancini JA, Rands E, Dixon RA, Diehl RE, Leveille C, Nathaniel D, . Leukotriene synthesis in U937 cells expressing recombinant 5-lipoxygenase. *J Lipid Mediat* 1993;7:31-45.
81. Coffey MJ, Wilcoxon SE, Peters-Golden M. Increases in 5-lipoxygenase activating protein expression account for enhanced capacity for 5-lipoxygenase metabolism that accompanies differentiation of peripheral blood monocytes into alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:153-158.
82. Byrum RS, Goulet JL, Griffiths RJ, Koller BH. Role of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in murine acute inflammatory responses. *J Exp Med* 1997;185:1065-1075.
83. Jakobsson PJ, Shaskin P, Larsson P, Feltenmark S, Odlander B, Aguilar-Santelises M, Jondal M, Biberfeld P, Claesson HE. Studies on the regulation and localization of 5-lipoxygenase in human B-lymphocytes. *Eur J Biochem* 1995;232:37-46.
84. Steinhilber D, Hoshiko S, Grunewald J, Radmark O, Samuelsson B. Serum factors regulate 5-lipoxygenase activity in maturing HL60 cells. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:1-8.
85. Charleson S, Evans JF, Leger S, Perrier H, Prasit P, Wang Z, Vickers PJ. Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein. *Eur J Pharmacol* 1994;267:275-280.
86. Hatzelmann A, Goossens J, Fruchtman R, Mohrs KH, Raddatz S, Muller-Peddinghaus R. Inversely-correlated inhibition of human 5-lipoxygenase activity by BAY X1005 and other quinoline derivatives in intact cells and a cell-free system--implications for the function of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochem Pharmacol* 1994;47:2259-2268.
87. Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wang Z, Prasit P, Vickers PJ. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett* 1993;318:277-281.

88. Channon JY, Leslie CC. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 1990;265:5409-5413.
89. Coffey M, Peters-Golden M, Fantone JC, III, Sporn PH. Membrane association of active 5-lipoxygenase in resting cells. Evidence for novel regulation of the enzyme in the rat alveolar macrophage. *J Biol Chem* 1992;267:570-576.
90. Peters-Golden M, Brock TG. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett* 2001;487:323-326.
91. Peters-Golden M, McNish RW. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:147-153.
92. Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Heibein JA, Charleson S, Singer II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:1935-1946.
93. Pouliot M, McDonald PP, Krump E, Mancini JA, McColl SR, Weech PK, Borgeat P. Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem* 1996;238:250-258.
94. Woods JW, Coffey MJ, Brock TG, Singer II, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* 1995;95:2035-2046.
95. Kargman S, Prasit P, Evans JF. Translocation of HL-60 cell 5-lipoxygenase. Inhibition of A23187- or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced translocation by indole and quinoline leukotriene synthesis inhibitors. *J Biol Chem* 1991;266:23745-23752.
96. Werz O, Klemm J, Samuelsson B, Radmark O. Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 2001;97:2487-2495.
97. Brock TG, Paine R, III, Peters-Golden M. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1994;269:22059-22066.
98. Chen XS, Naumann TA, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG, Funk CD. cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 1995;270:17993-17999.
99. Chen XS, Zhang YY, Funk CD. Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins. *J Biol Chem* 1998;273:31237-31244.
100. Healy AM, Peters-Golden M, Yao JP, Brock TG. Identification of a bipartite nuclear localization sequence necessary for nuclear import of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 1999;274:29812-29818.
101. Christmas P, Fox JW, Ursino SR, Soberman RJ. Differential localization of 5- and 15-lipoxygenases to the nuclear envelope in RAW macrophages. *J Biol Chem* 1999;274:25594-25598.

102. Lepley RA, Fitzpatrick FA. 5-Lipoxygenase compartmentalization in granulocytic cells is modulated by an internal bipartite nuclear localizing sequence and nuclear factor kappa B complex formation. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:71-76.
103. Jones SM, Luo M, Healy AM, Peters-Golden M, Brock TG. Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* 2002;277:38550-38556.
104. Jones SM, Luo M, Peters-Golden M, Brock TG. Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* 2003;278:10257-10263.
105. Brock TG, McNish RW, Bailie MB, Peters-Golden M. Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence. *J Biol Chem* 1997;272:8276-8280.
106. Covin RB, Brock TG, Bailie MB, Peters-Golden M. Altered expression and localization of 5-lipoxygenase accompany macrophage differentiation in the lung. *Am J Physiol* 1998;275:L303-L310.
107. Peters-Golden M, McNish RW, Hyzy R, Shelly C, Toews GB. Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol* 1990;144:263-270.
108. Luo M, Jones SM, Peters-Golden M, Brock TG. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12165-12170.
109. Brock TG, Anderson JA, Fries FP, Peters-Golden M, Sporn PH. Decreased leukotriene C4 synthesis accompanies adherence-dependent nuclear import of 5-lipoxygenase in human blood eosinophils. *J Immunol* 1999;162:1669-1676.
110. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186:909-920.
111. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M. Capacity for repeatable leukotriene generation after transient stimulation of mast cells and macrophages. *Biochem J* 1998;329:519-525.
112. Boden SE, Bertsche T, Ammon HP, Safayhi H. MEK-1/2 inhibition prevents 5-lipoxygenase translocation in N-formylpeptide-challenged human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:1069-1074.
113. Malaviya R, Malaviya R, Jakschik BA. Reversible translocation of 5-lipoxygenase in mast cells upon IgE/antigen stimulation. *J Biol Chem* 1993;268:4939-4944.
114. Chen XS, Funk CD. The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 2001;276:811-818.
115. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 1991;65:1043-1051.
116. Perisic O, Paterson HF, Mosedale G, Lara-Gonzalez S, Williams RL. Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1999;274:14979-14987.

117. Lepley RA, Muskardin DT, Fitzpatrick FA. Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 1996;271:6179-6184.
118. Lepley RA, Fitzpatrick FA. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks activation and redistribution of 5-lipoxygenase in HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1996;331:141-144.
119. Peters-Golden M, McNish RW, Sporn PH, Balazovich K. Basal activation of protein kinase C in rat alveolar macrophages: implications for arachidonate metabolism. *Am J Physiol* 1991;261:L462-L471.
120. Werz O, Klemm J, Samuelsson B, Radmark O. 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5261-5266.
121. Surette ME, Dallaire N, Jean N, Picard S, Borgeat P. Mechanisms of the priming effect of lipopolysaccharides on the biosynthesis of leukotriene B4 in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *FASEB J* 1998;12:1521-1531.
122. Lepley RA, Fitzpatrick FA. 5-Lipoxygenase contains a functional Src homology 3-binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* 1994;269:24163-24168.
123. VanderNoot VA, Fitzpatrick FA. Competitive binding assay of src homology domain 3 interactions between 5-lipoxygenase and growth factor receptor binding protein 2. *Anal Biochem* 1995;230:108-114.
124. Kang LT, Vanderhoek JY. Mono (S) hydroxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin. *J Lipid Res* 1998;39:1476-1482.
125. Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA, Jr. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:4349-4353.
126. Haurand M, Flohe L. Leukotriene formation by human polymorphonuclear leukocytes from endogenous arachidonate. Physiological triggers and modulation by prostanoids. *Biochem Pharmacol* 1989;38:2129-2137.
127. Peters-Golden M, McNish RW, Davis JA, Blackwood RA, Brock TG. Colchicine inhibits arachidonate release and 5-lipoxygenase action in alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1996;271:L1004-L1013.
128. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:545-76.:545-576.
129. de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Gerisch G. Coactosin, a 17 kDa F-actin binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993;26:181-191.
130. Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell* 1998;9:1951-1959.
131. Rohrig U, Gerisch G, Morozova L, Schleicher M, Wegner A. Coactosin interferes with the capping of actin filaments. *FEBS Lett* 1995;374:284-286.
132. Provost P, Samuelsson B, Radmark O. Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1881-1885.

133. Provost P, Doucet J, Stock A, Gerisch G, Samuelsson B, Radmark O. Coactosin-like protein, a human F-actin-binding protein: critical role of lysine-75. *Biochem J* 2001;359:255-263.
134. Miller YI, Chang MK, Funk CD, Feramisco JR, Witztum JL. 12/15-lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276:19431-19439.
135. Charng MJ, Zhang D, Kinnunen P, Schneider MD. A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor. *J Biol Chem* 1998;273:9365-9368.
136. Wurthner JU, Frank DB, Felici A, Green HM, Cao Z, Schneider MD, McNally JG, Lechleider RJ, Roberts AB. Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *J Biol Chem* 2001;276:19495-19502.
137. Brungs M, Radmark O, Samuelsson B, Steinhilber D. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:107-111.
138. Matsuda S, Ichigotani Y, Okuda T, Irimura T, Nakatsugawa S, Hamaguchi M. Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1490:163-169.
139. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366.
140. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:457-467.
141. Leslie CC. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997;272:16709-16712.
142. Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 1997;390:622-625.
143. Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki J, Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature* 1997;390:618-622.
144. Gijon MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol* 1999;65:330-336.
145. Gijon MA, Spencer DM, Siddiqi AR, Bonventre JV, Leslie CC. Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize calcium. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem* 2000;275:20146-20156.
146. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993;72:269-278.
147. Qiu ZH, Gijon MA, de Carvalho MS, Spencer DM, Leslie CC. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* 1998;273:8203-8211.

148. Clancy RM, Dahinden CA, Hugli TE. Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe or complement component C5a is independent of phospholipase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:7200-7204.
149. DiPersio JF, Billing P, Williams R, Gasson JC. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines prime human neutrophils for enhanced arachidonic acid release and leukotriene B4 synthesis. *J Immunol* 1988;140:4315-4322.
150. Doerfler ME, Danner RL, Shelhamer JH, Parrillo JE. Bacterial lipopolysaccharides prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B4. *J Clin Invest* 1989;83:970-977.
151. McColl SR, Krump E, Naccache PH, Poubelle PE, Braquet P, Braquet M, Borgeat P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the synthesis of leukotriene B4 by human neutrophils in response to platelet-activating factor. Enhancement of both arachidonic acid availability and 5-lipoxygenase activation. *J Immunol* 1991;146:1204-1211.
152. McDonald PP, McColl SR, Naccache PH, Borgeat P. Studies on the activation of human neutrophil 5-lipoxygenase induced by natural agonists and Ca²⁺ ionophore A23187. *Biochem J* 1991;280:379-385.
153. Salari H, Braquet P, Naccache P, Borgeat P. Characterization of effect of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on leukotriene synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1985;9:127-138.
154. Malaviya R, Chen CL, Navara C, Malaviya R, Liu XP, Keenan M, Waurzyniak B, Uckun FM. Treatment of allergic asthma by targeting janus kinase 3-dependent leukotriene synthesis in mast cells with 4-(3', 5'-dibromo-4'-hydroxyphenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P97). *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:912-926.
155. Werz O, Burkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J* 2002;16:1441-1443.
156. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270:7420-7426.
157. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;78:1027-1037.
158. Eom YW, Cho SH, Hwang JS, Yoon SB, Na DS, Kang IJ, Kang SS, Song WK, Kim JH. Rac and p38 kinase mediate 5-lipoxygenase translocation and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:126-132.
159. Werz O, Klemm J, Radmark O, Samuelsson B. p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. *J Leukoc Biol* 2001;70:830-838.

160. Werz O, Szellas D, Steinhilber D. Reactive oxygen species released from granulocytes stimulate 5-lipoxygenase activity in a B-lymphocytic cell line. *Eur J Biochem* 2000;267:1263-1269.
161. Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* 1993;268:6288-6292.
162. Werz O, Steinhilber D. Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells. *Eur J Biochem* 1996;242:90-97.
163. Hatzelmann A, Ullrich V. Regulation of 5-lipoxygenase activity by the glutathione status in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 1987;169:175-184.
164. Hatzelmann A, Schatz M, Ullrich V. Involvement of glutathione peroxidase activity in the stimulation of 5-lipoxygenase activity by glutathione-depleting agents in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 1989;180:527-533.
165. Jakobsson PJ, Steinhilber D, Odlander B, Radmark O, Claesson HE, Samuelsson B. On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3521-3525.
166. Huang HS, Chen CJ, Lu HS, Chang WC. Identification of a lipoxygenase inhibitor in A431 cells as a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 1998;424:22-26.
167. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1998;273:1990-1997.
168. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994;76:5-13.
169. Krump E, Lemay G, Borgeat P. Adenosine A2 receptor-induced inhibition of leukotriene B4 synthesis in whole blood ex vivo. *Br J Pharmacol* 1996;117:1639-1644.
170. Krump E, Picard S, Mancini J, Borgeat P. Suppression of leukotriene B4 biosynthesis by endogenous adenosine in ligand-activated human neutrophils. *J Exp Med* 1997;186:1401-1406.
171. Fonteh AN, Winkler JD, Torphy TJ, Heravi J, Udem BJ, Chilton FH. Influence of isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor biosynthesis in the human neutrophil. *J Immunol* 1993;151:339-350.
172. Flamand N, Surette ME, Picard S, Bourgoïn S, Borgeat P. Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Mol Pharmacol* 2002;62:250-256.
173. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
174. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *J Immunol* 2000;165:3592-3598.

175. Maccarrone M, Corasaniti MT, Guerrieri P, Nistico G, Finazzi AA. Nitric oxide-donor compounds inhibit lipoxygenase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:128-133.
176. Gilchrist M, McCauley SD, Befus AD. Expression, localization and regulation of nitric oxide synthase (NOS) in human mast cell lines: Effects on leukotriene production. *Blood* 2004;.[Epub ahead of print].
177. Goetzl EJ, Pickett WC. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J Immunol* 1980;125:1789-1791.
178. Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:218-223.
179. Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-948.
180. O'Flaherty JT, Rossi AG. 5-hydroxyicosatetraenoate stimulates neutrophils by a stereospecific, G protein-linked mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:14708-14714.
181. O'Flaherty JT, Rogers LC, Chadwell BA, Owen JS, Rao A, Cramer SD, Daniel LW. 5(S)-Hydroxy-6,8,11,14-E,Z,Z,Z-eicosatetraenoate stimulates PC3 cell signaling and growth by a receptor-dependent mechanism. *Cancer Res* 2002;62:6817-6819.
182. Hosoi T, Koguchi Y, Sugikawa E, Chikada A, Ogawa K, Tsuda N, Suto N, Tsunoda S, Taniguchi T, Ohnuki T. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem* 2002;277:31459-31465.
183. Badwey JA, Robinson JM, Horn W, Soberman RJ, Karnovsky MJ, Karnovsky ML. Synergistic stimulation of neutrophils. Possible involvement of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoate in superoxide release. *J Biol Chem* 1988;263:2779-2786.
184. Laychock SG. Effects of hydroxyeicosatetraenoic acids on fatty acid esterification in phospholipids and insulin secretion in pancreatic islets. *Endocrinology* 1985;117:1011-1019.
185. Richards CF, Johnson AR, Campbell WB. Specific incorporation of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid into phosphatidylcholine in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1986;875:569-581.
186. Richards CF, Campbell WB. Incorporation of hydroxyeicosatetraenoic acids into cellular lipids of adrenal glomerulosa cells: inhibition of aldosterone release by 5-HETE. *Prostaglandins* 1989;38:565-580.
187. Weitberg AB, Corvese D. Hydroxy- and hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acids induce DNA strand breaks in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1989;10:1029-1031.
188. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 2001;385:231-241.
189. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43.

190. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4312-4317.
191. Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* 1999;38:185-190.
192. Coleman RA, Eglen RM, Jones RL, Narumiya S, Shimizu T, Smith WL, Dahlen SE, Drazen JM, Gardiner PJ, Jackson WT, . Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995;23:283-5.:283-285.
193. Nicosia S, Capra V, Rovati GE. Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;14:3-19.
194. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL, Jr., Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000;275:30531-30536.
195. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL, Jr., Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 1999;399:789-793.
196. Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, Reinscheid RK, Lin SH, Civelli O. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol* 2000;58:1601-1608.
197. Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsey W, Sathe G, Muir AI, Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ, Hay DW. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 1999;56:657-663.
198. Takasaki J, Kamohara M, Matsumoto M, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T, Nishikawa T, Kawai Y, Masuho Y, Isogai T, Suzuki Y, Sugano S, Furuichi K. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:316-322.
199. Brink C, Dahlen SE, Drazen J, Evans JF, Hay DW, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev* 2003;55:195-227.
200. Dahlen SE. Pharmacological characterization of leukotriene receptors. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S41-S45.
201. Nicosia S, Capra V, Ravasi S, Enrico RG. Binding to cysteinyl-leukotriene receptors. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S46-S50.
202. Hui Y, Funk CD. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1549-1557.

203. Izumi T, Yokomizo T, Obinata H, Ogasawara H, Shimizu T. Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* 2002;132:1-6.
204. Frey EA, Nicholson DW, Metters KM. Characterization of the leukotriene D4 receptor in dimethylsulphoxide-differentiated U937 cells: comparison with the leukotriene D4 receptor in human lung and guinea-pig lung. *Eur J Pharmacol* 1993;244:239-250.
205. Thivierge M, Doty M, Johnson J, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 2000;165:5221-5226.
206. Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 2001;167:2855-2860.
207. Amrani Y, Moore PE, Hoffman R, Shore SA, Panettieri RA, Jr. Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2098-2101.
208. Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol* 2001;158:3-9.
209. Hoshino M, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase Calpha-Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J Biol Chem* 1998;273:4878-4882.
210. Mattern MR, Mong S, Mong SM, Bartus JO, Sarau HM, Clark MA, Foley JJ, Crooke ST. Transient activation of topoisomerase I in leukotriene D4 signal transduction in human cells. *Biochem J* 1990;265:101-107.
211. Paruchuri S, Hallberg B, Juhas M, Larsson C, Sjolander A. Leukotriene D(4) activates MAPK through a Ras-independent but PKCepsilon-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:1883-1893.
212. Bandeira-Melo C, Woods LJ, Phoofolo M, Weller PF. Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. *J Exp Med* 2002;196:841-850.
213. Bisgaard H, Pedersen M. SRS-A leukotrienes decrease the activity of human respiratory cilia. *Clin Allergy* 1987;17:95-103.
214. Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S, Lindgren JA, Samuelsson B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3887-3891.
215. Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:449-451.
216. Bisgaard H, Groth S. Bronchial effects of leukotriene D4 inhalation in normal human lung. *Clin Sci (Lond)* 1987;72:585-592.

217. Dahlen SE, Hedqvist P, Hammarstrom S, Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 1980;288:484-486.
218. Barnes NC, Piper PJ, Costello JF. Comparative effects of inhaled leukotriene C₄, leukotriene D₄, and histamine in normal human subjects. *Thorax* 1984;39:500-504.
219. Drazen JM. Comparative contractile responses to sulfidopeptide leukotrienes in normal and asthmatic human subjects. *Ann N Y Acad Sci* 1988;524:289-97.:289-297.
220. Hui KP, Barnes NC. Lung function improvement in asthma with a cysteinyl-leukotriene receptor antagonist. *Lancet* 1991;337:1062-1063.
221. Reiss TF, Sorkness CA, Stricker W, Botto A, Busse WW, Kundu S, Zhang J. Effects of montelukast (MK-0476); a potent cysteinyl leukotriene receptor antagonist, on bronchodilation in asthmatic subjects treated with and without inhaled corticosteroids. *Thorax* 1997;52:45-48.
222. Asano K, Lilly CM, O'Donnell WJ, Israel E, Fischer A, Ransil BJ, Drazen JM. Diurnal variation of urinary leukotriene E₄ and histamine excretion rates in normal subjects and patients with mild-to-moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:643-651.
223. Lam S, Chan H, LeRiche JC, Chan-Yeung M, Salari H. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:711-717.
224. Adelroth E, Morris MM, Hargreave FE, O'Byrne PM. Airway responsiveness to leukotrienes C₄ and D₄ and to methacholine in patients with asthma and normal controls. *N Engl J Med* 1986;315:480-484.
225. Samhoun MN, Conroy DM, Piper PJ. Pharmacological profile of leukotrienes E₄, N-acetyl E₄ and of four of their novel omega- and beta-oxidative metabolites in airways of guinea-pig and man in vitro. *Br J Pharmacol* 1989;98:1406-1412.
226. Aharony D, Catanese CA, Falcone RC. Kinetic and pharmacologic analysis of [³H]leukotriene E₄ binding to receptors on guinea pig lung membranes: evidence for selective binding to a subset of leukotriene D₄ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248:581-588.
227. Hanna CJ, Bach MK, Pare PD, Schellenberg RR. Slow-reacting substances (leukotrienes) contract human airway and pulmonary vascular smooth muscle in vitro. *Nature* 1981;290:343-344.
228. Schellenberg RR, Foster A. Differential activity of leukotrienes upon human pulmonary vein and artery. *Prostaglandins* 1984;27:475-482.
229. Allen SP, Chester AH, Piper PJ, Sampson AP, Akl ES, Yacoub MH. Effects of leukotrienes C₄ and D₄ on human isolated saphenous veins. *Br J Clin Pharmacol* 1992;34:409-414.
230. Berkowitz BA, Zabko-Potapovich B, Valocik R, Gleason JG. Effects of the leukotrienes on the vasculature and blood pressure of different species. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;229:105-112.
231. Kito G, Okuda H, Ohkawa S, Terao S, Kikuchi K. Contractile activities of leukotrienes C₄ and D₄ on vascular strips from rabbits. *Life Sci* 1981;29:1325-1332.

232. Back M, Norel X, Walch L, Gascard J, Mazmanian G, Dahlen S, Brink C. Antagonist resistant contractions of the porcine pulmonary artery by cysteinyl-leukotrienes. *Eur J Pharmacol* 2000;401:381-388.
233. Walch L, Norel X, Gascard JP, Brink C. Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S107-S111.
234. Sakuma I, Gross SS, Levi R. Peptidoleukotrienes induce an endothelium-dependent relaxation of guinea pig main pulmonary artery and thoracic aorta. *Prostaglandins* 1987;34:685-696.
235. Sakuma I, Levi R. Vasomotor effects of leukotrienes C4 and D4 on cavian pulmonary artery and aorta. Characterization and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1988;524:91-102.:91-102.
236. Ortiz JL, Labat C, Norel X, Gorenne I, Verley J, Brink C. Response to anti-human IgE in human pulmonary arteries. Regulation by endothelium. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1029-1033.
237. Ortiz JL, Gorenne I, Cortijo J, Seller A, Labat C, Sarria B, Abram TS, Gardiner PJ, Morcillo E, Brink C. Leukotriene receptors on human pulmonary vascular endothelium. *Br J Pharmacol* 1995;115:1382-1386.
238. Back M, Walch L, Norel X, Gascard JP, Mazmanian G, Brink C. Modulation of vascular tone and reactivity by nitric oxide in porcine pulmonary arteries and veins. *Acta Physiol Scand* 2002;174:9-15.
239. Burke JA, Levi R, Guo ZG, Corey EJ. Leukotrienes C4, D4 and E4: effects on human and guinea-pig cardiac preparations in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;221:235-241.
240. Roth DM, Lefler AM. Studies on the mechanism of leukotriene induced coronary artery constriction. *Prostaglandins* 1983;26:573-581.
241. Wargovich T, Mehta J, Nichols WW, Pepine CJ, Conti CR. Reduction in blood flow in normal and narrowed coronary arteries of dogs by leukotriene C4. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:1047-1051.
242. Evers AS, Murphree S, Saffitz JE, Jakschik BA, Needleman P. Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxane, and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction. *J Clin Invest* 1985;75:992-999.
243. Levi R, Burke JA. Cardiac anaphylaxis: SRS-A potentiates and extends the effects of released histamine. *Eur J Pharmacol* 1980;62:41-49.
244. Hock CE, Beck LD, Papa LA. Peptide leukotriene receptor antagonism in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1992;26:1206-1211.
245. Lepran I, Lefler AM. Protective actions of propyl gallate, a lipoxygenase inhibitor, on the ischemic myocardium. *Circ Shock* 1985;15:79-88.
246. Allen SP, Sampson AP, Piper PJ, Chester AH, Ohri SK, Yacoub MH. Enhanced excretion of urinary leukotriene E4 in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis* 1993;4:899-904.

247. Carry M, Korley V, Willerson JT, Weigelt L, Ford-Hutchinson AW, Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation* 1992;85:230-236.
248. Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1998;97:2406-2413.
249. Stanke-Labesque F, Devillier P, Veitl S, Caron F, Cracowski JL, Bessard G. Cysteinyl leukotrienes are involved in angiotensin II-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2001;49:152-160.
250. Hardy G, Stanke-Labesque F, Peoc'h M, Hakim A, Devillier P, Caron F, Morel S, Faure P, Halimi S, Bessard G. Cysteinyl leukotrienes modulate angiotensin II constrictor effects on aortas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1751-1758.
251. Shastri S, McNeill JR, Wilson TW, Poduri R, Kaul C, Gopalakrishnan V. Cysteinyl leukotrienes mediate enhanced vasoconstriction to angiotensin II but not endothelin-1 in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H342-H349.
252. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101:916-921.
253. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999;104:1001-1006.
254. Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma. *JAMA* 1997;278:1855-1873.
255. Baud L, Perez J, Denis M, Ardaillou R. Modulation of fibroblast proliferation by sulfidopeptide leukotrienes: effect of indomethacin. *J Immunol* 1987;138:1190-1195.
256. Modat G, Muller A, Mary A, Gregoire C, Bonne C. Differential effects of leukotrienes B4 and C4 on bovine aortic endothelial cell proliferation in vitro. *Prostaglandins* 1987;33:531-538.
257. Baud L, Sraer J, Perez J, Nivez MP, Ardaillou R. Leukotriene C4 binds to human glomerular epithelial cells and promotes their proliferation in vitro. *J Clin Invest* 1985;76:374-377.
258. Paruchuri S, Sjolander A. Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407. *J Biol Chem* 2003;278:45577-45585.
259. Porreca E, Di Febbo C, Di Sciullo A, Angelucci D, Nasuti M, Vitullo P, Reale M, Conti P, Cuccurullo F, Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost* 1996;76:99-104.
260. Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, Sato A, Takahashi T, Homma Y, Kawakami Y. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1907-1912.

261. Cohen P, Noveral JP, Bhala A, Nunn SE, Herrick DJ, Grunstein MM. Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis. *Am J Physiol* 1995;269:L151-L157.
262. Panettieri RA, Tan EM, Ciocca V, Luttmann MA, Leonard TB, Hay DW. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:453-461.
263. Phan SH, McGarry BM, Loeffler KM, Kunkel SL. Binding of leukotriene C4 to rat lung fibroblasts and stimulation of collagen synthesis in vitro. *Biochemistry* 1988;27:2846-2853.
264. Henderson WR, Jr., Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:108-116.
265. Wilborn J, Bailie M, Coffey M, Burdick M, Strieter R, Peters-Golden M. Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1996;97:1827-1836.
266. Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, Moore BB. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:229-235.
267. Beller TC, Friend DS, Maekawa A, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3047-3052.
268. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:651-663.
269. Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP, Evans JF. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:226-233.
270. Chan CC, McKee K, Tagari P, Chee P, Ford-Hutchinson A. Eosinophil-eicosanoid interactions: inhibition of eosinophil chemotaxis in vivo by a LTD4-receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1990;191:273-280.
271. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkka V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993;341:989-990.
272. Diamant Z, Hiltermann JT, van Rensen EL, Callenbach PM, Veselic-Charvat M, van d, V, Sont JK, Sterk PJ. The effect of inhaled leukotriene D4 and methacholine on sputum cell differentials in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1247-1253.
273. Turner CR, Smith WB, Andresen CJ, Swindell AC, Watson JW. Leukotriene D4 receptor antagonism reduces airway hyperresponsiveness in monkeys. *Pulm Pharmacol* 1994;7:49-58.
274. Irvin CG, Tu YP, Sheller JR, Funk CD. 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am J Physiol* 1997;272:L1053-L1058.

275. Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S113-S117.
276. Spada CS, Nieves AL, Krauss AH, Woodward DF. Comparison of leukotriene B4 and D4 effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J Leukoc Biol* 1994;55:183-191.
277. Kanwar S, Johnston B, Kubes P. Leukotriene C4/D4 induces P-selectin and sialyl Lewis(x)-dependent alterations in leukocyte kinetics in vivo. *Circ Res* 1995;77:879-887.
278. Pedersen KE, Bochner BS, Undem BJ. Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:655-662.
279. Lee E, Robertson T, Smith J, Kilfeather S. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1881-1886.
280. Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, Busse WW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:158-166.
281. Leff AR. Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S125-S132.
282. Mellor EA, Austen KF, Boyce JA. Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J Exp Med* 2002;195:583-592.
283. Suzuki M, Kato M, Kimura H, Fujii T, Morikawa A. Inhibition of human eosinophil activation by a cysteinyl leukotriene receptor antagonist (pranlukast; ONO-1078). *J Asthma* 2003;40:395-404.
284. Lindgren JA, Hokfelt T, Dahlen SE, Patrono C, Samuelsson B. Leukotrienes in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:6212-6216.
285. Miyamoto T, Lindgren JA, Hokfelt T, Samuelsson B. Regional distribution of leukotriene and mono-hydroxyeicosatetraenoic acid production in the rat brain. Highest leukotriene C4 formation in the hypothalamus. *FEBS Lett* 1987;216:123-127.
286. Schalling M, Neil A, Terenius L, Lindgren JA, Miyamoto T, Hokfelt T, Samuelsson B. Leukotriene C4 binding sites in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 1986;122:251-257.
287. Hulting AL, Lindgren JA, Hokfelt T, Eneroth P, Werner S, Patrono C, Samuelsson B. Leukotriene C4 as a mediator of luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:3834-3838.
288. Gerozissis K, Saadi M, Dray F. Leukotrienes C4 and D4 stimulate the release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat median eminence in vitro. *Brain Res* 1987;416:54-58.
289. Neu I, Mallinger J, Wildfeuer A, Mehlber L. Leukotrienes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 1992;86:586-587.

290. Winking M, Deinsberger W, Joedicke A, Boeker DK. Cysteinyl-leukotriene levels in intracerebral hemorrhage: an edema-promoting factor? *Cerebrovasc Dis* 1998;8:318-326.
291. Manev H, Uz T, Sugaya K, Qu T. Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in an aging brain. *FASEB J* 2000;14:1464-1469.
292. Qu T, Uz T, Manev H. Inflammatory 5-LOX mRNA and protein are increased in brain of aging rats. *Neurobiol Aging* 2000;21:647-652.
293. Uz T, Pesold C, Longone P, Manev H. Aging-associated up-regulation of neuronal 5-lipoxygenase expression: putative role in neuronal vulnerability. *FASEB J* 1998;12:439-449.
294. Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction. *Am J Pathol* 1987;126:19-24.
295. Arakawa H, Lotvall J, Kawikova I, Lofdahl CG, Skoogh BE. Leukotriene D4- and prostaglandin F2 alpha-induced airflow obstruction and airway plasma exudation in guinea-pig: role of thromboxane and its receptor. *Br J Pharmacol* 1993;110:127-132.
296. Evans TW, Rogers DF, Aursudkij B, Chung KF, Barnes PJ. Regional and time-dependent effects of inflammatory mediators on airway microvascular permeability in the guinea pig. *Clin Sci (Lond)* 1989;76:479-485.
297. Henderson WR, Jr. Role of leukotrienes in asthma. *Ann Allergy* 1994;72:272-278.
298. Bochnowicz S, Underwood DC. Dose-dependent mediation of leukotriene D4-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995;52:403-411.
299. Woodward DF, Wasserman MA, Weichman BM. Investigation of leukotriene involvement in the vasopermeability response associated with guinea pig tracheal anaphylaxis: comparison with cutaneous anaphylaxis. *Eur J Pharmacol* 1983;93:9-19.
300. Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J Biol Chem* 2002;277:20820-20824.
301. Coles SJ, Neill KH, Reid LM, Austen KF, Nii Y, Corey EJ, Lewis RA. Effects of leukotrienes C4 and D4 on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa. *Prostaglandins* 1983;25:155-170.
302. Hoffstein ST, Malo PE, Bugelski P, Wheeldon EB. Leukotriene D4 (LTD4) induces mucus secretion from goblet cells in the guinea pig respiratory epithelium. *Exp Lung Res* 1990;16:711-725.
303. Johnson HG, Chinn RA, Chow AW, Bach MK, Nadel JA. Leukotriene-C4 enhances mucus production from submucosal glands in canine trachea in vivo. *Int J Immunopharmacol* 1983;5:391-396.
304. Peatfield AC, Piper PJ, Richardson PS. The effect of leukotriene C4 on mucin release into the cat trachea in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 1982;77:391-393.
305. Russi EW, Abraham WM, Chapman GA, Stevenson JS, Codias E, Wanner A. Effects of leukotriene D4 on mucociliary and respiratory function in allergic and nonallergic sheep. *J Appl Physiol* 1985;59:1416-1422.

306. Claesson HE, Dahlen SE. Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J Intern Med* 1999;245:205-227.
307. Goppelt-Struebe M, Schaefer D, Habenicht AJ. Differential regulation of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) expression by glucocorticoids in monocytic cells. *Br J Pharmacol* 1997;122:619-624.
308. Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 1994;372:179-182.
309. Batt DG. 5-lipoxygenase inhibitors and their anti-inflammatory activities. *Prog Med Chem* 1992;29:1-63:1-63.
310. Ford-Hutchinson AW, Gresser M, Young RN. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* 1994;63:383-417:383-417.
311. McMillan RM, Walker ER. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:323-330.
312. Tateson JE, Randall RW, Reynolds CH, Jackson WP, Bhattacharjee P, Salmon JA, Garland LG. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br J Pharmacol* 1988;94:528-539.
313. Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, Summers JB, Brooks DW. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:929-937.
314. Bell RL, Lanni C, Malo PE, Brooks DW, Stewart AO, Hansen R, Rubin P, Carter GW. Preclinical and clinical activity of zileuton and A-78773. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:205-15:205-215.
315. Drazen JM. Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111:547-559.
316. Weinblatt ME, Kremer JM, Coblyn JS, Helfgott S, Maier AL, Petrillo G, Henson B, Rubin P, Sperling R. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992;19:1537-1541.
317. Brooks CD, Stewart AO, Basha A, Bhatia P, Ratajczyk JD, Martin JG, Craig RA, Kolasa T, Bouska JB, Lanni C, . (R)-(+)-N-[3-[5-[(4-fluorophenyl)methyl]-2-thienyl]-1-methyl-2-propynyl]-N-hydroxyurea (ABT-761), a second-generation 5-lipoxygenase inhibitor. *J Med Chem* 1995;38:4768-4775.
318. Lehnigk B, Rabe KF, Dent G, Herst RS, Carpentier PJ, Magnussen H. Effects of a 5-lipoxygenase inhibitor, ABT-761, on exercise-induced bronchoconstriction and urinary LTE₄ in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1998;11:617-623.
319. Crawley GC, Dowell RI, Edwards PN, Foster SJ, McMillan RM, Walker ER, Waterson D, Bird TG, Bruneau P, Giroaeau JM. Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem* 1992;35:2600-2609.
320. McMillan RM, Girodeau JM, Foster SJ. Selective chiral inhibitors of 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Br J Pharmacol* 1990;101:501-503.

321. McMillan RM, Bird TG, Crawley GC, Edwards MP, Girodeau JM, Kingston JF, Foster SJ. Methoxyalkyl thiazoles: a novel series of potent, orally active and enantioselective inhibitors of 5-lipoxygenase. *Agents Actions* 1991;34:110-112.
322. Bruneau P, Delvare C, Edwards MP, McMillan RM. Indazolinones, a new series of redox-active 5-lipoxygenase inhibitors with built-in selectivity and oral activity. *J Med Chem* 1991;34:1028-1036.
323. Ducharme Y, Brideau C, Dube D, Chan CC, Falguyret JP, Gillard JW, Guay J, Hutchinson JH, McFarlane CS, Riendeau D. Naphthalenic lignan lactones as selective, nonredox 5-lipoxygenase inhibitors. Synthesis and biological activity of (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran hybrids. *J Med Chem* 1994;37:512-518.
324. Kusner EJ, Buckner CK, Dea DM, DeHaas CJ, Marks RL, Krell RD. The 5-lipoxygenase inhibitors ZD2138 and ZM230487 are potent and selective inhibitors of several antigen-induced guinea-pig pulmonary responses. *Eur J Pharmacol* 1994;257:285-292.
325. Turner CR, Smith WB, Andresen CJ, Egglar JF, Watson JW. The effect of 5-lipoxygenase inhibition on *Ascaris* antigen (Ag)-induced responses in atopic monkeys. *Inflamm Res* 1996;45:42-49.
326. Smith WG, Shaffer AF, Currie JL, Thompson JM, Kim S, Rao T, Isakson PC. Characterization of 5-lipoxygenase inhibitors in biochemical and functional in vivo assays. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1332-1338.
327. Nasser SM, Bell GS, Hawksworth RJ, Spruce KE, MacMillan R, Williams AJ, Lee TH, Arm JP. Effect of the 5-lipoxygenase inhibitor ZD2138 on allergen-induced early and late asthmatic responses. *Thorax* 1994;49:743-748.
328. Werz O, Szellas D, Henseler M, Steinhilber D. Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol Pharmacol* 1998;54:445-451.
329. Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol* 2001;62:1433-1438.
330. Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HP. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:1143-1146.
331. Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Mol Pharmacol* 1995;47:1212-1216.
332. Gillard J, Ford-Hutchinson AW, Chan C, Charleson S, Denis D, Foster A, Fortin R, Leger S, McFarlane CS, Morton H. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67:456-464.
333. Depre M, Friedman B, Tanaka W, Van Hecken A, Buntinx A, DeSchepper PJ. Biochemical activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53:602-607.
334. Brideau C, Chan C, Charleson S, Denis D, Evans JF, Ford-Hutchinson AW, Fortin R, Gillard JW, Guay J, Guevremont D. Pharmacology of MK-0591 (3-[1-(4-

- chlorobenzyl)-3-(t-butylthio)-5-(quinolin-2-yl-methoxy)-indol-2-yl]-2,2-dimethyl propanoic acid), a potent, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70:799-807.
335. Diamant Z, Timmers MC, van d, V, Friedman BS, De Smet M, Depre M, Hilliard D, Bel EH, Sterk PJ. The effect of MK-0591, a novel 5-lipoxygenase activating protein inhibitor, on leukotriene biosynthesis and allergen-induced airway responses in asthmatic subjects in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:42-51.
336. Evans JF, Leville C, Mancini JA, Prasit P, Therien M, Zamboni R, Gauthier JY, Fortin R, Charleson P, MacIntyre DE. 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol Pharmacol* 1991;40:22-27.
337. Mancini JA, Prasit P, Coppolino MG, Charleson P, Leger S, Evans JF, Gillard JW, Vickers PJ. 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a novel hybrid of two classes of leukotriene biosynthesis inhibitors. *Mol Pharmacol* 1992;41:267-272.
338. Hatzelmann A, Fruchtmann R, Mohrs KH, Raddatz S, Muller-Peddinghaus R. Mode of action of the new selective leukotriene synthesis inhibitor BAY X 1005 ((R)-2-[4-(quinolin-2-yl-methoxy)phenyl]-2-cyclopentyl acetic acid) and structurally related compounds. *Biochem Pharmacol* 1993;45:101-111.
339. Muller-Peddinghaus R, Kohlsdorfer C, Theisen-Popp P, Fruchtmann R, Perzborn E, Beckermann B, Buhner K, Ahr HJ, Mohrs KH. BAY X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis: in vivo inflammation pharmacology and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267:51-57.
340. Fruchtmann R, Mohrs KH, Hatzelmann A, Raddatz S, Fugmann B, Junge B, Horstmann H, Muller-Peddinghaus R. In vitro pharmacology of BAY X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis. *Agents Actions* 1993;38:188-195.
341. Gorenne I, Labat C, Gascard JP, Norel X, Muller-Peddinghaus R, Mohrs KH, Taylor WA, Gardiner PJ, Brink C. (R)-2-[4-(quinolin-2-yl-methoxy)phenyl]-2-cyclopentyl] acetic acid (BAY x1005), a potent leukotriene synthesis inhibitor: effects on anti-IgE challenge in human airways. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:868-872.
342. Dahlen B, Kumlin M, Ihre E, Zetterstrom O, Dahlen SE. Inhibition of allergen-induced airway obstruction and leukotriene generation in atopic asthmatic subjects by the leukotriene biosynthesis inhibitor BAYx 1005. *Thorax* 1997;52:342-347.
343. Hatzelmann A, Fruchtmann R, Mohrs KH, Raddatz S, Matzke M, Pleiss U, Keldenich J, Muller-Peddinghaus R. Mode of action of the leukotriene synthesis (FLAP) inhibitor BAY X 1005: implications for biological regulation of 5-lipoxygenase. *Agents Actions* 1994;43:64-68.
344. Prasit P, Belley M, Blouin M, Brideau C, Chan C, Charleson S, Evans JF, Frenette R, Gauthier JY, Guay J. A new class of leukotriene biosynthesis inhibitor: the development of MK-0591. *J Lipid Mediat* 1993;6:239-244.
345. Nagata M, Sedgwick JB, Bates ME, Kita H, Busse WW. Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *J Immunol* 1995;155:2194-2202.
346. Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell Signal* 1995;7:171-184.

347. Goulet JL, Snouwaert JN, Latour AM, Coffman TM, Koller BH. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12852-12856.
348. Funk CD, Chen XS, Kurre U, Griffis G. Leukotriene-deficient mice generated by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995;23:145-50.:145-150.
349. Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:303-12.:303-312.
350. Kanaoka Y, Maekawa A, Penrose JF, Austen KF, Lam BK. Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C4 synthase. *J Biol Chem* 2001;276:22608-22613.
351. Austin SC, Funk CD. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999;58:231-252.
352. Secor WE, Powell MR, Morgan J, Wynn TA, Funk CD. Mice deficient for 5-lipoxygenase, but not leukocyte-type 12-lipoxygenase, display altered immune responses during infection with *Schistosoma mansoni*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998;56:291-304.
353. Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 1996;157:5221-5224.
354. Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 2001;69:2011-2016.
355. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ, Shih W. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 2002;91:120-126.
356. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2004;350:29-37.
357. Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Britti D, Sciarra G, De Sarro A, Caputi AP, Sautebin L. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 2003;110:120-130.
358. Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Caputi AP, Sautebin L. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to splanchnic artery occlusion shock. *Shock* 2003;20:230-236.
359. Goulet JL, Griffiths RC, Ruiz P, Mannon RB, Flannery P, Platt JL, Koller BH, Coffman TM. Deficiency of 5-lipoxygenase accelerates renal allograft rejection in mice. *J Immunol* 2001;167:6631-6636.
360. Griffiths RJ, Smith MA, Roach ML, Stock JL, Stam EJ, Milici AJ, Scampoli DN, Eskra JD, Byrum RS, Koller BH, McNeish JD. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J Exp Med* 1997;185:1123-1129.

361. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004;36:233-239.
362. Haeggstrom JZ, Wetterholm A, Shapiro R, Vallee BL, Samuelsson B. Leukotriene A4 hydrolase: a zinc metalloenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:965-970.
363. Minami M, Ohishi N, Mutoh H, Izumi T, Bito H, Wada H, Seyama Y, Toh H, Shimizu T. Leukotriene A4 hydrolase is a zinc-containing aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:620-626.
364. Byrum RS, Goulet JL, Snouwaert JN, Griffiths RJ, Koller BH. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. *J Immunol* 1999;163:6810-6819.
365. Penrose JF, Gagnon L, Goppelt-Struebe M, Myers P, Lam BK, Jack RM, Austen KF, Soberman RJ. Purification of human leukotriene C4 synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11603-11606.
366. Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S20-S24.
367. Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chevez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM, Matzuk MM. Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7923-7926.
368. Carter BZ, Shi ZZ, Barrios R, Lieberman MW. gamma-glutamyl leukotrienase, a gamma-glutamyl transpeptidase gene family member, is expressed primarily in spleen. *J Biol Chem* 1998;273:28277-28285.
369. Han B, Luo G, Shi ZZ, Barrios R, Atwood D, Liu W, Habib GM, Sifers RN, Corry DB, Lieberman MW. Gamma-glutamyl leukotrienase, a novel endothelial membrane protein, is specifically responsible for leukotriene D(4) formation in vivo. *Am J Pathol* 2002;161:481-490.
370. Shi ZZ, Han B, Habib GM, Matzuk MM, Lieberman MW. Disruption of gamma-glutamyl leukotrienase results in disruption of leukotriene D(4) synthesis in vivo and attenuation of the acute inflammatory response. *Mol Cell Biol* 2001;21:5389-5395.
371. Habib GM, Shi ZZ, Cuevas AA, Guo Q, Matzuk MM, Lieberman MW. Leukotriene D4 and cystinyl-bis-glycine metabolism in membrane-bound dipeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4859-4863.
372. Habib GM, Shi ZZ, Cuevas AA, Lieberman MW. Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family. *FASEB J* 2003;17:1313-1315.

373. Maekawa A, Kanaoka Y, Lam BK, Austen KF. Identification in mice of two isoforms of the cysteinyl leukotriene 1 receptor that result from alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2256-2261.
374. Martin V, Sawyer N, Stocco R, Unett D, Lerner MR, Abramovitz M, Funk CD. Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1193-1200.
375. Mollerup J, Jorgensen ST, Hougaard C, Hoffmann EK. Identification of a murine cysteinyl leukotriene receptor by expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1517:455-459.
376. Hui Y, Yang G, Galczenski H, Figueroa DJ, Austin CP, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Funk CD. The murine cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. cDNA and genomic cloning, alternative splicing, and in vitro characterization. *J Biol Chem* 2001;276:47489-47495.
377. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T, Izumi T. Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution. *J Biol Chem* 2002;277:18763-18768.
378. Tang DG, Chen YQ, Honn KV. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5241-5246.
379. Romano M, Catalano A, Nutini M, D'Urbano E, Crescenzi C, Claria J, Libner R, Davi G, Procopio A. 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J* 2001;15:2326-2336.
380. Uz T, Manev R, Manev H. 5-Lipoxygenase is required for proliferation of immature cerebellar granule neurons in vitro. *Eur J Pharmacol* 2001;418:15-22.
381. Walker JL, Loscalzo J, Zhang YY. 5-Lipoxygenase and human pulmonary artery endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H585-H593.
382. Romano M, Claria J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J* 2003;17:1986-1995.
383. Datta K, Biswal SS, Xu J, Towndrow KM, Feng X, Kehrer JP. A relationship between 5-lipoxygenase-activating protein and bcl-xL expression in murine pro-B lymphocytic FL5.12 cells. *J Biol Chem* 1998;273:28163-28169.
384. Datta K, Biswal SS, Kehrer JP. The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP. *Biochem J* 1999;340:371-375.
385. Wu X, Biswal SS, Kehrer JP. Roles of 5-lipoxygenase activating protein in cell proliferation and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 2003;19:135-143.
386. Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13182-13187.
387. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11280-11285.

388. Avis I, Hong SH, Martinez A, Moody T, Choi YH, Trepel J, Das R, Jett M, Mulshine JL. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 2001;15:2007-2009.
389. Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003;71:1-22.
390. Kehrer JP, Biswal SS, La E, Thuillier P, Datta K, Fischer SM, Vanden Heuvel JP. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)alpha by MK886. *Biochem J* 2001;356:899-906.
391. Avis IM, Jett M, Boyle T, Vos MD, Moody T, Treston AM, Martinez A, Mulshine JL. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. *J Clin Invest* 1996;97:806-813.
392. Braccioni F, Dorman SC, O'Byrne PM, Inman MD, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau GM. The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:96-101.
393. Ohd JF, Wikstrom K, Sjolander A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000;119:1007-1018.
394. Espinosa K, Bosse Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1032-1040.
395. Baud L, Perez J, Cherqui G, Cragoe EJ, Jr., Ardaillou R. Leukotriene D4-induced proliferation of glomerular epithelial cells: PKC- and Na⁺-H⁺ exchanger-mediated response. *Am J Physiol* 1989;257:C232-C239.
396. McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem* 2000;275:27566-27575.
397. McMahon B, Mitchell D, Shattock R, Martin F, Brady HR, Godson C. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J* 2002;16:1817-1819.
398. Wikstrom K, Juhas M, Sjolander A. The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochem J* 2003;371:115-124.
399. Stenke L, Mansour M, Reizenstein P, Lindgren JA. Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B4 and C4: interactions with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1993;81:352-356.
400. Atluru D, Goodwin JS. Leukotriene B4 causes proliferation of interleukin 2-dependent T cells in the presence of suboptimal levels of interleukin 2. *Cell Immunol* 1986;99:444-452.
401. Dugas B, Paul-Eugene N, Cairns J, Gordon J, Calenda A, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Leukotriene B4 potentiates the expression and release of Fc epsilon RII/CD23, and proliferation and differentiation of human B lymphocytes induced by IL-4. *J Immunol* 1990;145:3406-3411.

402. Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996;157:3105-3115.
403. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970;86:1436-1440.
404. Norrdin RW, Jee WS, High WB. The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990;41:139-149.
405. Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M, Gaskell SJ, Bonewald LF. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J Biol Chem* 1993;268:10087-10094.
406. Garcia C, Qiao M, Chen D, Kirchen M, Gallwitz W, Mundy GR, Bonewald LF. Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 1996;11:521-529.
407. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1996;11:1619-1627.
408. Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:3178-3184.
409. Compston JE, Vedi S, Croucher PI, Garrahan NJ, O'Sullivan MM. Bone turnover in non-steroid treated rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:163-166.
410. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924.
411. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793-795.
412. Cornicelli JA, Trivedi BK. 15-Lipoxygenase and its inhibition: a novel therapeutic target for vascular disease. *Curr Pharm Des* 1999;5:11-20.
413. Mehrabian M, Wong J, Wang X, Jiang Z, Shi W, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic locus in mice that blocks development of atherosclerosis despite extreme hyperlipidemia. *Circ Res* 2001;89:125-130.
414. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1238-1243.
415. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S38-53.:S38-S53.
416. Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003;327:143-147.
417. Keppler D, Huber M, Baumert T. Leukotrienes as mediators in diseases of the liver. *Semin Liver Dis* 1988;8:357-366.

418. Haggmann W, Kaiser I, Jakschik BA. The sensitized liver represents a rich source of endogenous leukotrienes. *Hepatology* 1991;13:482-488.
419. Cincu RN, Rodriguez-Ortigosa CM, Vesperinas I, Quiroga J, Prieto J. S-adenosyl-L-methionine protects the liver against the cholestatic, cytotoxic, and vasoactive effects of leukotriene D4: a study with isolated and perfused rat liver. *Hepatology* 1997;26:330-335.
420. Haussinger D, Stehle T, Gerok W. Effects of leukotrienes and the thromboxane A2 analogue U-46619 in isolated perfused rat liver. Metabolic, hemodynamic and ion-flux responses. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369:97-107.
421. Krell H, Dietze E. Hemodynamic and metabolic responses to leukotriene C4 in isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989;10:300-305.
422. Moore KP, Taylor GW, Maltby NH, Siegers D, Fuller RW, Dollery CT, Williams R. Increased production of cysteinyl leukotrienes in hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 1990;11:263-271.
423. Uemura M, Buchholz U, Kojima H, Keppler A, Hafkemeyer P, Fukui H, Tsujii T, Keppler D. Cysteinyl leukotrienes in the urine of patients with liver diseases. *Hepatology* 1994;20:804-812.
424. Uemura M, Lehmann WD, Schneider W, Seitz HK, Benner A, Keppler-Hafkemeyer A, Hafkemeyer P, Kojima H, Fujimoto M, Tsujii T, Fukui H, Keppler D. Enhanced urinary excretion of cysteinyl leukotrienes in patients with acute alcohol intoxication. *Gastroenterology* 2000;118:1140-1148.
425. Uemura M, Kojima H, Buchholz U, Kikuchi E, Matsumoto M, Kikukawa M, Imazu H, Fukui H, Tsujii T, Keppler D. Cysteinyl leukotrienes in the bile of patients with obstructive jaundice. *J Gastroenterol* 2002;37:821-830.
426. Farzaneh-Far R, Moore K. Cysteinyl-leukotrienes and the liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003;72:35-50.
427. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
428. Bataller R, Gines P. [New therapeutic strategies in liver fibrosis: pathogenic basis]. *Med Clin (Barc)* 2002;118:339-346.
429. Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:337-349.
430. Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989;84:1780-1785.
431. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990;11:599-605.
432. Shiratori Y, Geerts A, Ichida T, Kawase T, Wisse E. Kupffer cells from CCl4-induced fibrotic livers stimulate proliferation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1986;3:294-303.

433. Gressner AM, Zerbe O. Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture. *J Hepatol* 1987;5:299-310.
434. Gressner AM, Haarmann R. Regulation of hyaluronate synthesis in rat liver fat storing cell cultures by Kupffer cells. *J Hepatol* 1988;7:310-318.
435. Bosch J, Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000;32:141-156.
436. Bosch J, Abraldes JG, Groszmann R. Current management of portal hypertension. *J Hepatol* 2003;38 Suppl 1:S54-68..S54-S68.
437. Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001;5:629-644.
438. Zhang JX, Pegoli W, Jr., Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994;266:G624-G632.
439. Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992;90:642-646.
440. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology* 2003;37:4-12.
441. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol* 1993;17 Suppl 2:S38-40..S38-S40.
442. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, Angeli P, Porayko M, Moreau R, Garcia-Tsao G, Jimenez W, Planas R, Arroyo V. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258-266.
443. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004;350:1646-1654.
444. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192:245-261.
445. Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994;52:205-226.
446. Winwood PJ, Arthur MJ. Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:50-59.
447. Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 2003;124:445-458.
448. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549.

449. Masunaga H, Fujise N, Shiota A, Ogawa H, Sato Y, Imai E, Yasuda H, Higashio K. Preventive effects of the deleted form of hepatocyte growth factor against various liver injuries. *Eur J Pharmacol* 1998;342:267-279.
450. Murata T, Arii S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N, Imamura M. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001;35:474-481.
451. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2345-2349.
452. Tada S, Iwamoto H, Nakamura M, Sugimoto R, Enjoji M, Nakashima Y, Nawata H. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 2001;34:529-536.
453. Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Atsuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000;11:33-42.
454. Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology* 1999;29:719-727.
455. Zhu J, Wu J, Frizell E, Liu SL, Bashey R, Rubin R, Norton P, Zern MA. Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999;117:1198-1204.
456. Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Regression of hepatic fibrosis in hepatitis C with long-term interferon treatment. *Dig Dis Sci* 1998;43:2573-2576.
457. Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423.
458. Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-1313.
459. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000;132:517-524.
460. Sobesky R, Mathurin P, Charlotte F, Moussalli J, Olivi M, Vidaud M, Ratzu V, Opolon P, Poynard T. Modeling the impact of interferon alfa treatment on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C: a dynamic view. The Multivirc Group. *Gastroenterology* 1999;116:378-386.
461. Laskin DL. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 1990;10:293-304.
462. Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 1974;46:393-426.

463. Marugg RA, Gehr P, de Leeuw M. Secondary lysosomes as an integral part of the cytoskeleton: a morphological study in rat Kupffer cells. *J Struct Biol* 1990;105:146-153.
464. Sun WB, Han BL, Peng ZM, Li K, Ji Q, Chen J, Wang HZ, Ma RL. Effect of aging on cytoskeleton system of Kupffer cell and its phagocytic capacity. *World J Gastroenterol* 1998;4:77-79.
465. Sleyster EC, KnooK DL. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab Invest* 1982;47:484-490.
466. Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Grond J, Koudstaal J, Poppema S. Evidence for a migratory capability of rat Kupffer cells to portal tracts and hepatic lymph nodes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986;51:429-442.
467. Wisse E. Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver. In: Wisse E and KnooK DL, eds. *Kupffer cells and other sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier, 1977:33-60.
468. Litwin JA. Peroxidase-positive endothelial cells in rat liver. *Cell Tissue Res* 1984;238:635-642.
469. Stohr G, Deimann W, Fahimi HD. Peroxidase-positive endothelial cells in sinusoids of the mouse liver. *J Histochem Cytochem* 1978;26:409-411.
470. Steffan AM, Gendrault JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kim A. Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 1986;6:830-836.
471. Dan C, Wake K. Modes of endocytosis of latex particles in sinusoidal endothelial and Kupffer cells of normal and perfused rat liver. *Exp Cell Res* 1985;158:75-85.
472. Zafrani ES, Vasconcelos AW, Gourdin MF. Is detection of endogenous peroxidatic activity helpful in distinguishing Kupffer cells from endothelial cells in normal adult human liver? In: KnooK DL and Wisse E, eds. *Sinusoidal Liver Cells*. Amsterdam: Elsevier, 1982:505-506.
473. Brouwer A, Barelds RJ, de Leeuw AM, Blauw E, Plas A, Yap SH, van den Broek AM, KnooK DL. Isolation and culture of Kupffer cells from human liver. Ultrastructure, endocytosis and prostaglandin synthesis. *J Hepatol* 1988;6:36-49.
474. Hoedemakers RM, Morselt HW, Scherphof GL, Daemen T. Heterogeneity in secretory responses of rat liver macrophages of different size. *Liver* 1995;15:313-319.
475. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985;54:589-599.
476. Wacker HH, Radzun HJ, Parwaresch MR. Ki-M2R, a new specific monoclonal antibody, discriminates tissue macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 1985;38:509-520.
477. Ukai K, Terashima K, Fujii Y, Imai Y. A new monoclonal antibody, UFT-4, reacting with rat Kupffer cells. Immunohistochemical and immunoelectron microscopical analysis with reestimation of the reticuloendothelial system. *Acta Pathol Jpn* 1988;38:1391-1403.

478. Bodenheimer HC, Jr., Faris RA, Charland C, Hixson DC. Characterization of a new monoclonal antibody to rat macrophages and Kupffer cells. *Hepatology* 1988;8:1667-1672.
479. Maruiwa M, Mizoguchi A, Russell GJ, Narula N, Stronska M, Mizoguchi E, Rabb H, Arnaout MA, Bhan AK. Anti-KCA-3, a monoclonal antibody reactive with a rat complement C3 receptor, distinguishes Kupffer cells from other macrophages. *J Immunol* 1993;150:4019-4030.
480. Lee SH, Starkey PM, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. J Exp Med* 1985;161:475-489.
481. Malorny U, Michels E, Sorg C. A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes. *Cell Tissue Res* 1986;243:421-428.
482. Burt AD, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Morphologic investigation of sinusoidal cells. *Semin Liver Dis* 1993;13:21-38.
483. Shiratori Y, Tananka M, Kawase T, Shiina S, Komatsu Y, Omata M. Quantification of sinusoidal cell function in vivo. *Semin Liver Dis* 1993;13:39-49.
484. Fox ES, Broitman SA, Thomas P. Bacterial endotoxins and the liver. *Lab Invest* 1990;63:733-741.
485. Van Bossuyt H, Wisse E. Cultured Kupffer cells, isolated from human and rat liver biopsies, ingest endotoxin. *J Hepatol* 1988;7:45-56.
486. Rogoff TM, Lipsky PE. Role of the Kupffer cells in local and systemic immune responses. *Gastroenterology* 1981;80:854-860.
487. Schuurman B, Heuff G, Beelen RH, Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon-gamma: a mechanistic study at the cellular level. *Cell Immunol* 1995;165:141-147.
488. Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M, Decker K. Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in vitro. *Eur J Biochem* 1981;119:171-175.
489. Kawada N, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Morisawa S, Monna T, Yamamoto S. Interferon gamma modulates production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by murine Kupffer cells. *Liver* 1991;11:42-47.
490. Heuff G, van de Loosdrecht AA, Betjes MG, Beelen RH, Meijer S. Isolation and purification of large quantities of fresh human Kupffer cells, which are cytotoxic against colon carcinoma. *Hepatology* 1995;21:740-745.
491. Chen GG, Lau WY, Lai PB, Chun YS, Chak EC, Leung BC, Lam IK, Lee JF, Chui AK. Activation of Kupffer cells inhibits tumor growth in a murine model system. *Int J Cancer* 2002;99:713-720.
492. Laskin DL. Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 1990;10:293-304.
493. Planaguma A, Titos E, Lopez-Parra M, Gaya J, Pueyo G, Arroyo V, Claria J. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor

- alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J* 2002;16:1937-1939.
494. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 1986;6:718-722.
495. Mochida S, Ogata I, Ohta Y, Yamada S, Fujiwara K. In situ evaluation of the stimulatory state of hepatic macrophages based on their ability to produce superoxide anions in rats. *J Pathol* 1989;158:67-71.
496. Hoedemakers RM, Morselt HW, Scherphof GL, Daemen T. Heterogeneity in secretory responses of rat liver macrophages of different size. *Liver* 1995;15:313-319.
497. Tomita M, Yamamoto K, Kobashi H, Ohmoto M, Tsuji T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology* 1994;20:317-325.
498. Zwadlo G, Brocker EB, von Bassewitz DB, Feige U, Sorg C. A monoclonal antibody to a differentiation antigen present on mature human macrophages and absent from monocytes. *J Immunol* 1985;134:1487-1492.
499. Hoedemakers RM, Scherphof GL, Daemen T. Proliferation of rat liver macrophages in vitro: influence of hemopoietic growth factors. *Hepatology* 1994;19:666-674.
500. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol* 2001;70:163-170.
501. van Furth R. Monocyte origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 1980;6:87-92.
502. Naito M, Takahashi K. The role of Kupffer cells in glucan-induced granuloma formation in the liver of mice depleted of blood monocytes by administration of strontium-89. *Lab Invest* 1991;64:664-674.
503. Tarling JD, Lin HS, Hsu S. Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J Leukoc Biol* 1987;42:443-446.
504. Yamada M, Naito M, Takahashi K. Kupffer cell proliferation and glucan-induced granuloma formation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *J Leukoc Biol* 1990;47:195-205.
505. Miyakawa K, Myint YY, Takahashi K. Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on proliferation, differentiation and survival of Kupffer cells in the liver of adult mice. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:329-335.
506. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 1997;39:350-364.
507. Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech* 1997;39:350-364.
508. Bouwens L, KnooK DL, Wisse E. Local proliferation and extrahepatic recruitment of liver macrophages (Kupffer cells) in partial-body irradiated rats. *J Leukoc Biol* 1986;39:687-697.
509. Hoedemakers RM, Scherphof GL, Daemen T. Proliferation of rat liver macrophages in vitro: influence of hemopoietic growth factors. *Hepatology* 1994;19:666-674.

510. Honda Y, Takahashi K, Naito M, Fujiyama S. The role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and proliferation of Kupffer cells in the liver of protein-deprived mice. *Lab Invest* 1995;72:696-706.
511. Naito M, Hayashi S, Yoshida H, Nishikawa S, Shultz LD, Takahashi K. Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in 'osteopetrosis' (op) mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 1991;139:657-667.
512. Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 1988;6:50-56.
513. Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 1988;6:50-56.
514. Alric L, Orfila C, Carrere N, Beraud M, Carrera G, Lepert JC, Duffaut M, Pipy B, Vinel JP. Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced in rats by CCl₄. *Inflamm Res* 2000;49:700-707.
515. Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 1988;6:50-56.
516. Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001;71:226-240.
517. Thompson WD, Jack AS, Patrick RS. The possible role of macrophages in transient hepatic fibrogenesis induced by acute carbon tetrachloride injury. *J Pathol* 1980;130:65-73.
518. Lough J, Rosenthal L, Arzoumanian A, Goresky CA. Kupffer cell depletion associated with capillarization of liver sinusoids in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *J Hepatol* 1987;5:190-198.
519. Bouwens L. Proliferation and phenotypic expression of non-parenchymal liver cells. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1988;151:46-51.:46-51.
520. Johnson SJ, Hines JE, Burt AD. Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J Pathol* 1992;166:351-358.
521. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;119:275-279.
522. Winwood PJ, Schuppan D, Iredale JP, Kawser CA, Docherty AJ, Arthur MJ. Kupffer cell-derived 95-kd type IV collagenase/gelatinase B: characterization and expression in cultured cells. *Hepatology* 1995;22:304-315.
523. Perez HD, Roll FJ, Bissell DM, Shak S, Goldstein IM. Production of chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes by cultured rat hepatocytes exposed to ethanol. *J Clin Invest* 1984;74:1350-1357.
524. Shirley MA, Reidhead CT, Murphy RC. Chemotactic LTB₄ metabolites produced by hepatocytes in the presence of ethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:604-610.

525. Shimada K, Navarro J, Goeger DE, Mustafa SB, Weigel PH, Weinman SA. Expression and regulation of leukotriene-synthesis enzymes in rat liver cells. *Hepatology* 1998;28:1275-1281.
526. Tran-Thi TA, Gyufko K, Henninger H, Busse R, Decker K. Studies on synthesis and degradation of eicosanoids by rat hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 1987;5:322-331.
527. Marcus AJ. Transcellular metabolism of eicosanoids. *Prog Hemost Thromb* 1986;8:127-42.:127-142.
528. Feinmark SJ, Cannon PJ. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1986;261:16466-16472.
529. Fukai F, Suzuki Y, Ohtaki H, Katayama T. Rat hepatocytes generate peptide leukotrienes from leukotriene A4. *Arch Biochem Biophys* 1993;305:378-384.
530. Fukai F, Suzuki Y, Nishizawa Y, Katayama T. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes by Kupffer cell-hepatocyte cooperation in rat liver. *Cell Biol Int* 1996;20:423-428.
531. Scoggan KA, Jakobsson PJ, Ford-Hutchinson AW. Production of leukotriene C4 in different human tissues is attributable to distinct membrane bound biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 1997;272:10182-10187.
532. Bioulac-Sage P, Le Bail B, Balabaud C. Structure of the liver. Liver and biliary tract histology. 2nd ed. Oxford, England: Oxford University Press, 2004.
533. Peters-Golden M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S227-S231.
534. Dickinson Zimmer JS, Voelker DR, Bernlohr DA, Murphy RC. Stabilization of leukotriene A4 by epithelial fatty acid-binding protein in the rat basophilic leukemia cell. *J Biol Chem* 2004;279:7420-7426.
535. Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves GM, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997;113:615-624.
536. Bataller R, Nicolas JM, Ginees P, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Lario S, Tobias E, Pinzani M, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol* 1998;29:398-408.
537. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:2-5.
538. Dumitriu D, Prie S, Bernier SG, Guillemette G, Sirois P. Mechanism of action of leukotriene D4 on guinea pig tracheal smooth muscle cells: roles of Ca⁺⁺ influx and intracellular Ca⁺⁺ release. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:1357-1365.
539. Palmberg L, Lindgren JA, Thyberg J, Claesson HE. On the mechanism of induction of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells by leukotrienes. Possible role of

- prostaglandin endoperoxide synthase products and platelet-derived growth factor. *J Cell Sci* 1991;98:141-149.
540. Crofton RW, Diesselhoff-den Dulk MM, van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med* 1978;148:1-17.
541. Tsukui T, Kikuchi K, Mabuchi A, Sudo T, Sakamoto T, Sato N, Tsuneoka K, Shikita M, Aida T, Asano G, . Production of macrophage colony-stimulating factor by adult murine parenchymal liver cells (hepatocytes). *J Leukoc Biol* 1992;52:383-389.
542. Bouwens L, Baekeland M, Wisse E. Importance of local proliferation in the expanding Kupffer cell population of rat liver after zymosan stimulation and partial hepatectomy. *Hepatology* 1984;4:213-219.
543. Yoshimoto T, Yokoyama C, Ochi K, Yamamoto S, Maki Y, Ashida Y, Terao S, Shiraishi M. 2,3,5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochim Biophys Acta* 1982;713:470-473.
544. Lee E, Lindo T, Jackson N, Meng-Choong L, Reynolds P, Hill A, Haswell M, Jackson S, Kilfeather S. Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2079-2085.
545. Pasquale D, Chikkappa G. Lipoxygenase products regulate proliferation of granulocyte-macrophage progenitors. *Exp Hematol* 1993;21:1361-1365.
546. Dittmann KH, Mayer C, Rodemann HP, Petrides PE, Denzlinger C. MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, induces antiproliferative effects and apoptosis in HL-60 cells. *Leuk Res* 1998;22:49-53.
547. Ghosh J, Myers CE. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:418-423.
548. Ou D, Bonomi P, Jao W, Jadko S, Harris JE, Anderson KM. The mode of cell death in H-358 lung cancer cells cultured with inhibitors of 5-lipoxygenase or the free radical spin trap, NTBN. *Cancer Lett* 2001;166:223-231.
549. Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry* 1997;28:253-263.
550. King MA, Radicchi-Mastroianni MA, Wells JV. There is substantial nuclear and cellular disintegration before detectable phosphatidylserine exposure during the camptothecin-induced apoptosis of HL-60 cells. *Cytometry* 2000;40:10-18.
551. Canaider S, Solito E, de Coupade C, Flower RJ, Russo-Marie F, Goulding NJ, Perretti M. Increased apoptosis in U937 cells over-expressing lipocortin 1 (annexin I). *Life Sci* 2000;66:L265-L270.
552. Anderson KM, Seed T, Meng J, Ou D, Alrefai WA, Harris JE. Five-lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid. *Anticancer Res* 1998;18:791-800.
553. Kondo K, Umemura K, Ohmura T, Hashimoto H, Nakashima M. Suppression of intimal hyperplasia by a 5-lipoxygenase inhibitor, MK-886: studies with a photochemical model of endothelial injury. *Thromb Haemost* 1998;79:635-639.

554. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43:506-520.
555. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* 1972;74:450-454.

