

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

EFECTOS ANTICANCEROSOS DE POLIFENOLES
NATURALES: PETEROSTILBENO Y QUERCETINA

PAULA FERRER PASTOR

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 2 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Guillermo Sáez Tormo
- D^a. Elena Obrador Pla
- D. Daniel Ramón Vidal
- D. Juan Carlos Espín de Gea
- D^a. Rosa María Lamuela Raventos

Va ser dirigida per:
D. José Estrela Arigüel

©Copyright: Servei de Publicacions
Paula Ferrer Pastor

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7174-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología



EFECTOS ANTICANCEROSOS DE POLIFENOLES NATURALES: PTEROSTILBENO Y QUERCETINA

PAULA FERRER PASTOR

D. JOSÉ MARÍA ESTRELA ARIGÜEL, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia, D. MIGUEL A. ASENSI MIRALLES, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia y D^a. MARIA TERESA VAREA MUÑOZ, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que la memoria titulada “Efectos anticancerosos de polifenoles naturales: Pterostilbeno y Quercetina”, presentada por D^a. Paula Ferrer Pastor para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Valencia.

Antes de comenzar con mi tesis, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a superar este escalón más de mi vida:

En primer lugar, quisiera dedicar esta tesis a la persona más importante para mi, la que siempre me ha hecho mantenerme en lo más alto, mi madre, gracias mamá, esta tesis es tuya.

Y ahora sigo, aunque tengo mucho que decir, seré breve...

Gracias a mis profesores que tanto me han ayudado, a mis directores de tesis Jose M^a Estrela, Miguel Asensi (por ser genial) y a Teresa Varea que ante la adversidad en la que nos hemos encontrado, siempre me ha sabido apoyar y aclarar mis interminables dudas.

Y hablando de dudas orgánicas, recuerdo a muchos profesores a los que les tengo que dar las gracias de corazón, a Gregorio, a Mercedes, a Rosella, a Elena y a mis queridos compañeros y amigos, como Nuria, Minerva, Jaime y Salva.

Ahora me toca dedicar este trabajo a los de "Fisio", mi departamento, el de las alegrías y penas, pero siempre con el mejor humor...

A Gambini, gracias porque desde el primer día has estado pendiente de mi...

A Ramón, que me enseñó muchas cosas, entre ellas a tomarme la vida con alegría y serenidad...

A Sonia, por su compañía...

A Salvita, por su comprensión y su sabiduría.

A Julian y Angel, mis profes y compañeros, mis ídolos, porque saben, trabajan, se divierten y siempre ayudan en todo y a todos con el máximo interés ¡gracias por ser así!

A Maria, con la que he compartido mis traumas y sensaciones.

A Fátima que me ha sabido comprender y animar con una visión muy realista de la vida.

A Javier que cada mañana me ha recibido con las mejores palabras, animándome día tras día, y gracias a su Vannina, nuestra Vannina, que siempre me ha ofrecido todo su cariño.

A Toni, a quien SIEMPRE recordaré...

Y a los demás profesores del departamento a Andrés y Esperanza, a Elena, a Jose...

Además, agradecerle a Salva que siempre haya tratado de ayudarnos con los problemas técnicos que nos iban surgiendo.

A mi familia, a Tita, a Juli, a Machús, a Pilar, a Suso, gracias a María, mi hermanita protectora, siempre pendiente de mi y a David que me ha ayudado muchísimo con la informática ¡gracias David!, a Javier, a Emilio, a Horten y a Jose.

Y a mis sobris, a Carmen, a Julio, a Alejandra, a Pablito, a Ali, a Claudita, a mi Davidín, por la alegría e ilusión que me han aportado.

A mi amigo Mario que en una etapa muy difícil de mi doctorado estuvo a mi lado, animándome con todas sus fuerzas.

A mis amigas, las del Mareny (Roci, Cris, Itziar, Ainhoa, Maria, Silvi, Natalia, Isa, Ali, Eva...) y las del cole (Maria, Elsi y Nuria), con las que he vivido momentos maravillosos y otros no tanto. Gracias porque a pesar de todo, siempre habéis estado para escucharme.

Y no por ser el último es menos importante sino, todo lo contrario, gracias a Nicolás.

Gracias Nico por hacer que todo tenga un sentido, por ser así, por tu alegría, por tu serenidad, por tu super paciencia, por tus ganas de vivir. Gracias por apoyarme tanto y por haber hecho que conociera a tu familia, a tus padres Dani y Esther, que me han acogido como a una hija más, y a tus hermanos, Dani y Sergio, que forman mi segunda familia.

Gracias a todos los que me rodeáis con cariño porque hacéis que cada día merezca la pena.

A papá...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. NEOPLASIA

1.1. Consideraciones generales. Concepto de neoplasia	1
1.2. Fases del proceso neoplásico. Implicaciones moleculares	3
1.2.1. Formación del tumor primario	4
1.2.2. Angiogénesis	7
1.2.3. Invasión primaria	13
1.2.4. Diseminación de las células tumorales. Concepto de metástasis	28
1.2.5. Formación de metástasis e ineficiencia metastásica	38

2. RADICALES LIBRES Y CÁNCER

2.1. Especies reactivas del oxígeno. Generalidades	41
2.1.1. Formación de ROS en sistemas biológicos	46
2.1.2. Mecanismos de acción de los radicales libres: mutagénesis	51
2.1.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo	55
2.1.4. ROS y progresión tumoral	65

2.2. Óxido nítrico y especies reactivas del nitrógeno.	
Generalidades	70
2.2.1. Formación de NO y RNS	72
2.2.2. Mecanismos de acción del NO y de las RNS	76
2.2.3. Efectos tumorigénicos y tumorocidas del NO	79
3. POLIFENOLES NATURALES	
3.1. Polifenoles naturales y salud	81
3.2. Clasificación y estructura química de polifenoles	83
3.3. Polifenoles y efecto canceroso	87
3.4. Biodisponibilidad de los polifenoles	91
3.4.1. Resveratrol y biodisponibilidad	98
OBJETIVOS	101
MATERIALES Y MÉTODOS	103
1. MATERIALES	
1.1. Sustrato biológico	103
1.1.1. Animales de experimentación	103
1.1.2. Cultivos de las células de melanoma B16	104
1.2. Materiales e instrumental de laboratorio	104
1.3. Reactivos y productos químicos	110
2. MÉTODOS	
2.1. Síntesis de <i>t</i> -PTER	110

2.1.1. Fundamento de la reacción de HECK	111
2.1.2. Fundamento de la reacción de WITTIG	112
2.1.3. Obtención del 3,5-dimetoxiestireno	114
2.1.4. Obtención del <i>t</i> -PTER	116
2.2. Administración <i>in vivo</i> del t-PTER y QUER	
2.2.1. Fundamento	118
2.2.2. Procedimiento	119
2.3. Determinación por HPLC-MS/MS	
2.3.1. Fundamento	120
2.3.2. Procedimiento de determinación de los distintos compuestos	120
2.4. Cultivo de B16M-F10 e inhibición del crecimiento tumoral <i>in vitro</i>	
2.4.1. Fundamento	127
2.4.2. Procedimiento	127
2.4.3. Cálculos	128
2.5. Aislamiento y cultivo de las células B16M-F10	
2.5.1. Fundamento	128
2.5.2. Procedimiento	128
2.6. Ensayo de adhesión y citotoxicidad inducida por el endotelio	
2.6.1. Fundamento	132
2.6.2. Preparación de citoquinas	132
2.6.3. Procedimiento	133
2.6.4. Cálculos	134
2.7. Ensayo de invasión <i>in vitro</i>	

2.7.1. Fundamento	135
2.7.2. Procedimiento	136
2.7.3. Cálculos	136
2.8. Determinación de la expresión de VLA-4 y VCAM-1 por citometría de flujo	
2.8.1. Fundamento	137
2.8.2. Procedimiento	137
2.8.3. Cálculos	138
2.9. Técnica de RT-PCR	
2.9.1. Fundamento	138
2.9.2. Procedimiento	139
2.9.3. Cálculos	141
2.10. Metástasis experimental	
2.10.1. Fundamento	142
2.10.2. Procedimiento	142
2.10.3. Cálculos	143
2.11. Microscopía <i>in vivo</i>	144
2.12. Aislamiento de las células B16M-F10	144
2.13. Análisis de la Bcl-2	
2.13.1. Fundamento	145
2.13.2. Procedimiento	145
2.13.3. Cálculos	146
2.14. Obtención de la línea estable B16M-F10/tet-Bcl-2	
2.14.1. Fundamento	147

2.14.2. Procedimiento	147
2.15. Medida de H ₂ O ₂ y NO	
2.15.1. Fundamento	148
2.15.2. Procedimiento y cálculos	149
2.16. Ratones eNOS-deficientes	
2.16.1. Fundamento	150
2.16.2. Procedimiento	151
2.17. Medida de la actividad de iNOS en células B16M-F10	
2.17.1. Fundamento	152
2.17.2. Procedimiento	152
2.17.3. Cálculos	153
2.18. Análisis por Western Blot de CREB	
2.18.1. Fundamento	153
2.18.2. Procedimiento	153
2.18.3. Cálculos	154
2.19. Ensayo con esfingomielinasa	
2.19.1. Fundamento	155
2.19.2. Procedimiento	155
2.20. Análisis estadísticos	156

RESULTADOS

1. Niveles plasmáticos de <i>t</i> -PTER y QUER	157
1.1. Administración oral	157
1.2. Administración intravenosa	159

2. Niveles extravasculares de <i>t</i> -PTER y QUER	160
3. Efecto del <i>t</i> -PTER y QUER sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de las células B16M-F10	163
4. Interacción <i>in vitro</i> entre las células B16M-F10 con el HSE	165
5. Expresión de las moléculas de adhesión intercelular	170
6. Expresión de los genes pro y antiapoptóticos en las células B16M-F10	172
7. Metástasis hepática <i>in vivo</i>	174
8. Efecto de <i>t</i> -PTER y QUER sobre la producción de NO y H ₂ O ₂ por las células B16M-F10	178
9. Efecto de <i>t</i> -PTER y QUER sobre la generación de NO y H ₂ O ₂ durante la adhesión de las células B16M-F10 al HSE	181
10. Interacción <i>in vitro</i> entre las células B16M-F10 con el HSE eNOS (+/+) y eNOS (-/-)	185
11. Regulación de la expresión de <i>bcl-2</i> por el NO en células B16M-F10	188
12. Estudio de la actividad de CREB en células B16M-F10 en presencia de <i>t</i> -PTER y QUER	190
13. Estudio de la activación de N-SMasa y de los niveles de ceramida, a partir del NO liberado por el HSE, en presencia de <i>t</i> -PTER y QUER	192

DISCUSIÓN

- | | |
|--|-----|
| 1. Biodisponibilidad de <i>t</i> -PTER y QUER | 195 |
| 2. Efecto de <i>t</i> -PTER y QUER sobre la producción antitumoral <i>in vitro</i> | 201 |
| 3. Efecto antitumoral del <i>t</i> -PTER y QUER <i>in vivo</i> | 205 |
| 4. Implicaciones moleculares en el efecto antitumoral de <i>t</i> -PTER y QUER | 207 |

CONCLUSIONES 215

BIBLIOGRAFÍA 217

ABREVIATURAS 285

INTRODUCCIÓN

1. NEOPLASIA

1.1. Consideraciones generales. Concepto de neoplasia

El cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte en los países desarrollados sólo superado por las enfermedades cardiovasculares (OMS). Sin embargo, aún más angustioso que la tasa de mortalidad es el sufrimiento físico y emocional que originan las neoplasias.

Literalmente, neoplasia significa “crecimiento nuevo”. Según la definición de Willis, una neoplasia consiste en “una masa anormal de tejido cuyo crecimiento supera al de los tejidos normales sin estar coordinado con él, persistiendo de la misma forma excesiva después de la interrupción del estímulo que desencadenó el cambio”.

En relación con el origen de todas las neoplasias, es fundamental la pérdida de la capacidad de respuesta a los controles normales de crecimiento. Se dice que las células normales se han transformado porque continúan dividiéndose indiferentes, en apariencia, a las influencias reguladoras que

controlan el crecimiento celular normal. Además parece que las neoplasias se comportan como parásitos y compiten con las células de tejidos normales por los elementos que necesitan para satisfacer sus necesidades metabólicas.

Las neoplasias gozan así mismo de un cierto grado de autonomía y crecen de forma más o menos continua con independencia del microambiente local y del estado nutricional de huésped. Sin embargo, esta autonomía no es completa y algunas neoplasias necesitan un sostén endocrino. Además, todas las neoplasias, sin excepción, dependen del huésped para su nutrición e irrigación.

En el lenguaje médico habitual, las neoplasias suelen denominarse tumores y de su estudio se encarga la oncología (de *oncos*, "tumor" y *logos*, "estudio de"). En oncología es importante dividir las neoplasias en benignas y malignas, una división que se basa en un juicio sobre el comportamiento clínico de cada tumor.

Un tumor es benigno cuando sus características tisulares macro y microscópicas son relativamente inocentes, no se propagará a otras localizaciones distintas de la primera y, en general, puede solucionarse mediante extirpación quirúrgica local. No obstante, hay que insistir en que los tumores benignos pueden producir cuadros clínicos graves.

A los tumores malignos se les denomina en conjunto *cánceres*, palabra que deriva del vocablo latino “cancro” *cangrejo*, ya que se adhieren e infiltran. El adjetivo *maligno* aplicado a una neoplasia significa que la lesión puede infiltrar y destruir las estructuras adyacentes y propagarse a lugares distantes (metástasis).

1.2. Fases del proceso neoplásico. Implicaciones moleculares

Podemos generalizar las etapas del proceso neoplásico en tres.

En la primera se produce un crecimiento celular local, caracterizado por la transformación de una o varias células de un tejido, que se reproducen a pesar de las restricciones normales, y la formación de un tumor primario.

En la segunda se pierde la cohesión celular, se produce la invasión y colonización de tejidos circundantes y tras la intravasación (vía sanguínea o linfática) se alcanza un órgano distante.

De este modo, las células pueden entrar en la tercera fase, caracterizada por el crecimiento tumoral secundario, o permanecer en un estado de latencia y reactivarse a medio o largo plazo. Las células que forman el tumor secundario han sufrido, a lo largo del proceso, una fuerte selección poblacional

y son susceptibles de portar un fenotipo diferente al del tumor primario (Arvelo y Poupon, 2001).

Una neoplasia maligna supone tumorigenicidad e invasividad, eventos independientes genéticamente que se inician en este orden pero que se solapan parcialmente. Así pues, aquellas mutaciones que proporcionan a las células tumorales la capacidad de invadir y formar metástasis comienzan a acumularse durante la fase de formación del tumor primario. La selección clonal posterior y las adaptaciones al estrés, pueden configurar el perfil genético que finalmente portan las células metastásicas.

1.2.1. Formación del tumor primario

El proceso neoplásico está caracterizado por una pérdida del control del ciclo y de la diferenciación celular formándose de este modo una masa tumoral primaria.

Se ha observado que existen, al menos, 291 genes mutados que son causa de oncogénesis entre los aproximadamente, 25.000 genes identificados en el genoma humano (Ensembl Human Genome Browser web page). Es decir, que se han observado mutaciones relacionadas con el cáncer en más del 1% de los genes conocidos (Futreal y cols., 2004). En la mayoría de los casos las alteraciones en el DNA son irrelevantes o son reparadas. Si las alteraciones se producen

en genes críticos, suelen ser letales para la célula, por lo que no dan lugar a la formación de tumor (Jakobisiak y cols., 2003). Además, existen genes supresores de tumores, el primero que se descubrió fue el gen RB (Nevins J.R., 2001). Otro guardián del genoma, es el TP53 (antes denominado p53), uno de los genes que con mayor frecuencia muta en los cánceres humanos. La activación del TP53 normal por agentes nocivos del DNA o por hipoxia supone la detención del ciclo celular en la fase G1 y la inducción de la reparación del DNA mediante la activación de la transcripción de genes inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina CDKN1A (p21) y GADD45. Si el DNA se repara satisfactoriamente, el ciclo celular podrá continuar. Sin embargo, si la reparación fracasa, la activación del gen BAX, inducida por TP53, pondrá en marcha la apoptosis. En células con mutaciones o pérdidas de TP53, la lesión del DNA no conlleva la detención del ciclo celular ni a la reparación del DNA, por lo que las células con alteraciones genéticas proliferan y terminan por generar un proceso neoplásico (Lui Y y Kulesz-Martin M., 2001).

Las mutaciones que activan los protooncogenes, codifican proteínas que activan la proliferación celular, inhiben la diferenciación celular y bloquean la apoptosis; aunque también pueden darse mutaciones que inhiban los genes supresores de tumores (por ejemplo, el gen TP53 anteriormente citado). Estas últimas son las más interesantes. La contribución al proceso

maligno de las proteínas supresoras de tumores sólo es posible cuando se pierde la función en ambos alelos del gen (Perez-Ortiz y cols., 2000). Mutaciones en estos dos tipos de genes son los responsables de la proliferación celular incontrolada que se observa en las células cancerígenas (Liebermann y cols., 1995).

El sistema de control de la división celular puede estar alterado por DNA ajeno introducido en la célula por un virus. De hecho, el estudio en profundidad de la genética molecular del cáncer se inició a partir del estudio de estos oncovirus, lo cual preparó el camino para la explosión de hallazgos sobre oncogenes y protooncogenes (Alberts y cols., 2000).

Cuando se forma un tumor primario puede mantenerse como una neoplasia benigna localizada en su lugar de origen. Por ejemplo, dado que los fibromas y adenomas crecen lentamente, la mayoría desarrollan una cápsula fibrosa que los rodea y los separa del tejido huésped. Es posible, que esta cápsula proceda del estroma del tejido original y que se forme a medida que las células parenquimatosas se atrofian a causa de la presión ejercida por el tumor en crecimiento. El estroma tumoral también puede contribuir a su formación. Sin embargo, hay que insistir que no todos los tumores benignos están encapsulados. Además de las mutaciones ordinarias que pueden desembocar en la formación de un tumor primario,

existe otro tipo de cambio genético que puede facilitar la formación de un tumor maligno.

En la formación del tumor primario, teóricamente pueden acumularse mutaciones que confieran la capacidad de metastatizar. De hecho, en muchas ocasiones cuando un tumor primario es detectado, ya contiene células con capacidad de invadir otros órganos. Por tanto, existe la posibilidad de que alguna de estas células con capacidad invasiva haya escapado, vía sanguínea o linfática, y alcanzado otra localización. Una vez en el nuevo órgano puede dar lugar a la formación de un tumor secundario o mantenerse en un estado de latencia.

1.2.2. Angiogénesis

Los vasos sanguíneos se forman mediante dos procesos: *vasculogenia*, que consiste en la creación de la red vascular primitiva a partir de angioblastos (precursores de las células endoteliales durante el desarrollo embrionario), y *angiogenia* o *neovascularización*, en el que vasos preexistentes emiten yemas capilares para formar nuevos vasos. La angiogenia es una parte esencial de la cicatrización de zonas lesionadas, del desarrollo de circulación colateral en áreas de isquemia, y supone un paso necesario para la progresión y propagación de un tumor (Rak y Yu, 2004). Por ello, los mecanismos

subyacentes a esta neovascularización son objeto de investigación, y están empezando a aparecer tratamientos destinados por ejemplo, a mejorar el riego sanguíneo de un corazón dañado por la aterosclerosis (Singer A.J. y cols., 1999) o a inhibirlo con objeto de frustrar el crecimiento tumoral.

Podemos definir pues la angiogénesis como la formación de vasos sanguíneos a partir de capilares ya existentes (Carmeliet, 2000).

Al igual que los tejidos normales, los tumores precisan de un adecuado aporte de nutrientes y oxígeno, así como de una vía efectiva para la eliminación de desechos celulares (Papetti y Herman, 2002). Estos requerimientos pueden variar entre diferentes tumores y pueden ser modificados en el curso de la progresión tumoral (Hlatky y cols., 2002).

Normalmente, en individuos adultos la vascularización es quiescente. Las células endoteliales, junto con las neuronas, se encuentran entre las células de mayor longevidad (Bergers y Benjamin, 2003). La formación de vasos sanguíneos es un proceso fisiológico que ocurre;

- Durante la **vasculogénesis embrionaria de novo** a partir de los angioblastos (Bergers and Benjamin, 2003);
- En el **endometrio** durante el ciclo reproductivo de la mujer fértil;
- En el **ovario** durante el crecimiento de la red folicular;

- En la formación de la **placenta**;
- En la **reparación de tejidos** (Sánchez-Socarrás, 2001);
- En **órganos** que se encuentran **en crecimiento** fisiológico (Hanahan y Folkman, 1996).

Durante la angiogénesis fisiológica los nuevos vasos formados se estabilizan tras una maduración rápida. Por el contrario, los vasos tumorales no alcanzan un estado de quiescencia, y su formación no se detiene. Por esta razón, los vasos formados muestran una serie de características que los hacen diferentes a los vasos normales como, por ejemplo, un contorno y morfología irregular, están dilatados, pueden tener un extremo final, y no están organizados en vénulas, arteriolas y capilares sino que muestran una estructura caótica (Bergers y Benjamin, 2003). A menudo los vasos que se forman en los tumores son permeables y hemorrágicos, en parte debido a la sobreproducción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y a la menor abundancia en células perivasculares (en estrecho contacto con las células endoteliales) (Baluk y cols., 2003; Benjamin y cols., 1999; Morikawa y cols., 2002). También se han observado células tumorales integradas entre las células vasculares del tumor (Folberg y cols., 2000) y, además, algunos tumores son capaces de reclutar células precursoras endoteliales producidas en la médula ósea (Lyden y cols., 2001). Todas estas anomalías a nivel funcional y

estructural son indicativas de la naturaleza patológica de la angiogénesis tumoral.

La angiogénesis puede ocurrir en diferentes estadios de la progresión tumoral dependiendo tanto del tumor como del microambiente tisular (Bergers y Benjamin, 2003). Así pues, se han observado tumores con baja capacidad angiogénica, como el astrocitoma, en el que hay proliferación de células tumorales a lo largo de los vasos sanguíneos cerebrales y sólo se observa angiogénesis cuando el tamaño del tumor es considerable. Este último caso es el del glioblastoma, donde las condiciones de hipoxia inducen la formación de nuevos vasos (Holash y cols., 1999). Por el contrario, se han observado tumores como el tumor cerebral pilocítico, con una elevada capacidad angiogénica pero con baja capacidad de progresión y de metastatizar (Tomlinson y cols., 1994).

La angiogénesis es un proceso estrictamente regulado por el balance entre señales pro- y antiangiogénicas (Hanahan y Folkman, 1996), producidas tanto por las células tumorales como por el tejido normal (Hlatky y cols., 1994). El desarrollo de un vaso capilar conlleva cuatro etapas (Sage, 1997):

- **Degradación** proteolítica de la **membrana basal** del vaso progenitor, lo que permite la formación de una yema capilar

- **Migración** de las células endoteliales hacia el foco del estímulo angiogénico (la masa tumoral).
- **Proliferación** de células endoteliales por detrás del frente de células emigrantes
- **Maduración de células endoteliales**, con inhibición de su crecimiento y organización en tubos capilares; este paso comprende el reclutamiento y proliferación de los pericitos (en los capilares) y de células musculares lisas (en los vasos de mayor calibre) que sirven de sostén al tubo endotelial y proveen de funciones accesorias.

La angiogénesis puede ser activada por diferentes procesos como, la respuesta a una situación de hipoxia, la estimulación paracrina o una inflamación (Rak y Yu, 2004).

Entre los factores proangiogénicos actúan factores de crecimiento como el VEGF, posiblemente el más ubicuo; el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que fue el primero en ser descubierto; el factor de crecimiento transformante β (TGF- β); el factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento placentario (Bergers y Benjamin, 2003).

También podemos encontrar citoquinas como la interleuquina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α); metaloproteinasas de la matriz (MMP) como la MMP-9 (actúa sobre el VEGF para permitir la unión a su receptor) (Bergers y

Benjamin, 2003), la MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MT-MMP (enzimas que permiten la degradación y posterior remodelación de las membranas basales subendoteliales) (Fidler, 2000).

Así mismo, mientras los tumores son capaces de activar la angiogénesis, también se puede limitar la progresión tumoral mediante inhibidores de la formación de nuevos vasos (Folkman, 1971). De hecho, aunque en la actualidad su uso clínico está limitado por las roturas causadas por diferentes peptidasas, el estudio sobre moléculas antiangiogénicas en la terapia tumoral es muy intenso. Algunos ejemplos de moléculas antiangiogénicas son la trombospondina plaquetaria o la endostatina. Esta última, en tumores murinos, inhibe la proliferación y produce regresión tumoral (Verheul y cols., 2004)

La expresión de oncogenes y proteínas supresoras de tumores también influye en el balance angiogénico. La expresión del oncogen ras se ha correlacionado con un aumento en la expresión del factor proangiogénico VEGF. También se ha observado como células con defectos en la expresión de p53 muestran una disminución en la expresión de trombospondina 1 (Bergers y Benjamin, 2003; Harada y cols., 2003). Así pues, mutaciones en oncogenes y proteínas supresoras de tumores pueden afectar de forma directa a la vascularización tumoral, tanto en el tumor primario como en el secundario.

1.2.3. Invasión primaria

En la invasión primaria se produce la colonización del tejido adyacente al tumor primario. La invasión es un proceso fisiológico que puede observarse en el desarrollo embrionario y fetal, en la vasculogénesis, en la neurogénesis, etc. La única diferencia entre la invasión fisiológica y la maligna es que esta última no cesa (Liotta y cols., 1991). En condiciones fisiológicas el proceso de invasión está sujeto a una regulación temporal y espacial. En la patogénesis tumoral, en la cual se ha adquirido un fenotipo maligno invasivo, no hay una respuesta correcta a los estímulos activadores e inhibidores, produciéndose una pérdida en el equilibrio celular. La adquisición de fenotipo maligno sólo se produce en una pequeña subpoblación de células tumorales, de hecho, sólo un 0.05% de las células son capaces de metastatizar (Liotta y cols., 1974).

La adquisición de fenotipo maligno invasivo tiene relación con el microambiente formado por las células tumorales y el tejido que lo rodea (Wernert, 1997). En dicho microambiente las células del hospedador participan en la inducción, selección y expansión de las células neoplásicas; a su vez, las células tumorales producen y liberan factores de crecimiento y citoquinas, reclutando a las células del estroma (Brown y cols., 1999). La transición de un carcinoma normal a uno invasivo está precedido, o es simultáneo, por una activación del estroma circundante.

De hecho, dicha activación queda patente en las modificaciones que se pueden observar en la matriz extracelular, las que favorecen la invasión de las células cancerosas (Liotta y Kohn, 2001).

Lo primero que se produce es la rotura de la membrana basal sobre la que se asienta el tumor, a continuación, atraviesa el tejido conjuntivo intersticial y, por último, accede a la circulación penetrando la membrana basal vascular. Este ciclo se repite cuando las embolias de células tumorales se extravasan en un lugar distinto al de origen.

Para explicar el paso de las células tumorales a través de la matriz, Liotta y colaboradores propusieron en 1983 un mecanismo en tres etapas (Liotta y cols., 1983):

- **Adhesión** de las células tumorales a la membrana basal.
- **Degradación** proteolítica de la membrana basal.
- **Migración celular.**

Antes de la adhesión a la membrana basal, es fundamental que se produzca la separación de las células tumorales entre sí.

1.2.3.1. Disociación de las células tumorales

La capacidad de las células tumorales para disociarse del tumor primario y migrar activamente está inversamente relacionada con su grado de diferenciación. De hecho, se ha observado que un bloqueo de la diferenciación es una característica morfológica constante para muchos tumores malignos (Gabbert, 1985). A nivel molecular la disociación de las células tumorales requiere la pérdida de las uniones intercelulares (Engers y Gabbert, 2000).

Existen distintas **moléculas de adhesión celular**

Las moléculas de adhesión celular (CAM) tienen la función de establecer contactos célula-célula y célula-matriz intercelular.

Todas las CAM muestran 3 características básicas (Freemont, 1998):

- Son glicoproteínas y actúan como **mediadoras moleculares entre el exterior y el interior** celular a través de los tres dominios que las constituyen: extracelular, transmembrana e intracelular.
- Se unen a un ligando específico que actúa como un **estímulo externo**.
- El **dominio intracelular se une a otras moléculas** para ejercer su función.

Dichas moléculas pueden ser enzimas, formar parte del citoesqueleto o inducir cambios químicos intracelulares. Podemos agrupar las moléculas de adhesión celular en **6 superfamilias**:

a) Familia de las inmunoglobulinas: Poseen uno o más dominios de inmunoglobulina y median interacciones tanto homofílicas como heterofílicas. Están implicadas en la adhesión intercelular Ca^{2+} -independiente (Engers y Gabbert, 2000). Dentro de esta familia se encuentran moléculas que son utilizadas frecuentemente en la identificación celular por los patólogos, como p.e. CD3, CD4 y CD8. También pertenecen a esta familia moléculas implicadas en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos (Freemont, 1998); así como, moléculas que participan en el proceso de interacción de los leucocitos con el endotelio vascular durante los procesos inflamatorios (Mackay y Imhof, 1993). De hecho, citoquinas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1, inducen la expresión de: moléculas de adhesión intercelular (ICAM), moléculas de adhesión celular vascular (VCAM) y moléculas de adhesión celular endotelio/plaquetas en las células endoteliales (receptores que reconocen integrinas de la superficie de los leucocitos y que permiten su retención y posterior extravasación) (Bevilacqua y cols., 1989; Marlin y Springer, 1987; Osborn y cols., 1989). Como veremos más adelante,

este fenómeno es imitado por las células metastáticas (Honn y Tang, 1992).

b) Cadherinas: Están implicadas en la adhesión intercelular Ca^{2+} -dependiente. Son las moléculas más importantes en las interacciones homotípicas célula-célula. La cadherina E (cadherina epitelial) es la mejor conocida por su papel como supresor de invasión y metástasis (Engers y Gabbert, 2000). Las cadherinas se unen entre sí a través del dominio extracelular. El dominio intracelular se une a un grupo de moléculas conocidas como cateninas, las cuales interaccionan con los filamentos intermedios del citoesqueleto (Takeichi, 1991). De esta forma el complejo cadherina-catenina une el citoesqueleto a los cambios que se producen en el medio extracelular.

c) Integrinas: Son moléculas de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas forman una familia que engloba más de 20 miembros y todos son heterodímeros transmembrana, la mayoría de ellos poseen la capacidad de interaccionar con varios componentes de la matriz extracelular (Engers y Gabbert, 2000). En la adhesión se requiere la presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} (Freemont, 1998). Las integrinas no sólo participan en la unión sino también en la transducción de señales. De esta forma pueden influir en diferentes funciones celulares como p.e. en la migración, la apoptosis, la diferenciación y la proliferación (Brooks y cols., 1994; Giancotti

y Ruoslahti, 1999). La unión de las integrinas a la matriz extracelular hace que éstas se agreguen en la superficie, y que se forme una asociación con proteínas en el interior celular. Esta asociación permite la unión con el citoesqueleto, quinasas citoplasmáticas y receptores transmembrana de factores de crecimiento (Giancotti y Ruoslahti, 1999).

d) Receptor de proteínas, tirosín fosfatasas: Participan en la señalización intercelular y en la regulación de la unión célula-célula. Son moléculas que poseen un dominio citoplasmático que actúa como una tirosín fosfatasa. De esta forma tienen la capacidad de modular diferentes eventos intracelulares (Tonks, 1993).

e) Selectinas: Son glucoproteínas Ca^{2+} dependientes de la membrana celular. Poseen, como las lectinas, dominios de unión a carbohidratos en su porción extracelular (Lasky, 1992). Podemos clasificar las selectinas en tres grupos: las selectinas L, participan en la adhesión específica de linfocitos a células endoteliales de nódulos linfáticos periféricos; las selectinas E, participan como mediadores del proceso inflamatorio en la adhesión leucocito-célula endotelial; las selectinas P, se encuentran en los cuerpos Wiebel-Palade de las células endoteliales, y en los gránulos α de las plaquetas. Son liberados durante la activación plaquetaria para mediar la unión leucocito-plaqueta (Freemont, 1998).

f) Receptores de ácido hialurónico: Grupo definido funcionalmente más que estructuralmente. El ácido hialurónico es uno de los principales componentes de la matriz extracelular, especialmente abundante en el tejido conectivo de la dermis de la piel, en la lámina propia de las membranas mucosas y en la adventicia que rodea los vasos sanguíneos. Además, se encuentra en la membrana de algunas células. Por ejemplo, las células epiteliales en división activa y las tumorales invasivas contienen cantidades significativamente mayores de ácido hialurónico que sus homólogas quiescentes o no tumorales. La causa podría ser, en el caso de las células tumorales, la secreción activa de ácido hialurónico. De acuerdo con esta hipótesis, se han detectado niveles elevados de ácido hialurónico en el suero de pacientes cancerosos, existiendo una cierta correlación con la agresividad tumoral (Guo y cols., 1994). Las células se unen al ácido hialurónico a través de un receptor de la superficie celular, el mejor caracterizado es el receptor CD44 (Peach y cols., 1993; Stoolman, 1989). Por *splicing* alternativo se evidencian diferentes isoformas del receptor CD44 con diferentes funciones y capacidades de unión al ácido hialurónico (Dougherty y cols., 1994).

En el proceso de invasión primaria se hacen necesarios una serie de cambios en la adhesión intercelular. Se ha observado que, aunque con algunas peculiaridades, el proceso de diseminación tumoral tiene cierto paralelismo con la respuesta

inflamatoria. Esto no es muy sorprendente ya que las células tumorales entran y salen de la circulación de forma muy similar a como lo hacen las células inflamatorias.

En algunos carcinomas gástricos, durante la adquisición del fenotipo invasivo, existe una buena correlación entre una disminución en la expresión de cadherina E y la transición a un estado indiferenciado (Becker y cols., 1994). De hecho, se ha observado en diferentes líneas celulares tumorales humanas, cómo la invasión *in vitro* en una matriz de colágeno estaba inversamente relacionada con la expresión de cadherina E, y cómo se podía inhibir la invasión por transfección de dicha cadherina con un vector de expresión (Vleminckx y cols., 1991). También se han encontrado, en los carcinomas de mama, mutaciones en el gen de la cadherina E que dan lugar a proteínas con un dominio extracelular alterado; así como una disminución en la expresión de cadherina E en otros carcinomas. Todo ello sugiere que la cadherina E actúa como un supresor de la invasividad, y que su pérdida es un indicador de desdiferenciación y aumento de la invasividad en el carcinoma de mama (Birchmeier y Behrens, 1994). Sin embargo, no se ha podido demostrar un posible carácter antimetastático general, puesto que, algunos tipos de células tumorales mantienen la expresión de cadherina E, incluso a niveles superiores a los del tumor primario, y siguen siendo altamente metastáticas (Takeichi, 1991). También se han

observado diversas alteraciones en cada una de las superfamilias de moléculas de adhesión. Por ejemplo, en estudios sobre aberraciones genéticas llevadas a cabo en carcinomas de colon, se observó una deleción común en un gen del cromosoma 18q (DCC, deleted in colorectal cancer) que codifica para una proteína homóloga a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Freemont, 1998).

1.2.3.2. Fijación a la membrana basal

Las células que vayan a invadir el tejido circundante deben de unirse a la membrana basal subyacente y esto lo hacen a partir de proteínas de la membrana, como laminina y fibronectina, de este modo se puede iniciar el proceso de invasión y posterior diseminación.

Las células epiteliales normales cuentan con receptores para la laminina que están polarizados en su superficie basal. A su vez, las células de los carcinomas poseen muchos más receptores que, además, se distribuyen por toda la superficie de la membrana basal.

1.2.3.3. Proteólisis

Para que la invasión tenga éxito, ya sea en la colonización del tejido que rodea al tumor primario o en la migración hacia un

órgano, se precisa de la degradación de la matriz extracelular. En 1952 R.A. Willis escribió “Es cierto que los tumores producen metabolitos solubles capaces de afectar al tejido circundante”; aunque ya en 1934 Purr había sugerido que la lisis del estroma por proteasas ácidas estaba involucrada en el proceso de invasión (Weiss, 2000). En la invasión, las células tumorales deben atravesar la matriz extracelular compuesta por proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas filamentosas. Aunque los estudios realizados se han centrado en los enzimas histolíticos producidos por las células cancerosas, los tumores contienen otras células que también son fuentes de enzimas, particularmente los macrófagos (Weiss, 2000).

Desde 1993 se ha aceptado la existencia de 4 grupos de proteasas que participan en la degradación de la matriz extracelular (Engers y Gabbert, 2000):

- **Metaloproteinasas de la matriz (MMPs)**
- **Serina proteinasas**, como el activador tisular plasminógeno del (tPA) o el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)
- **Cisteína proteinasas**, como las catepsinas B, C, H y L
- **Aspartato proteinasas**, como la catepsina D

De todos los grupos, los 2 primeros han sido los más intensamente investigados. Las actividades de ambos grupos de enzimas están reguladas a diferentes niveles: transcripción,

estabilidad del mRNA, traslación, secreción y activación de proenzimas, inhibición específica, degradación y/o eliminación de los enzimas activos (Seiki, 2002).

Las MMPs comprenden una familia de al menos 21 miembros con la capacidad de hidrolizar componentes de la matriz, integrinas o receptores, factores de crecimiento, citoquinas y proteasas de otras familias (Hornebeck y Maquart, 2003). La activación de estas enzimas se produce mediante varias cascadas y, paradójicamente, los niveles fisiológicos de enzima activo son muy bajos.

Esto sugiere que la degradación de la matriz en la migración celular se encuentra focalizada en un microambiente que contiene elevados niveles de MMPs asociados a la membrana plasmática (Hernandez-Barrantes y cols., 2002; Hornebeck y cols., 2002; Quaranta, 2000).

Las MMPs son secretadas como proenzimas que requieren una posterior activación extracelular mediante rotura proteolítica (Chambers y Matrisian, 1997). Se pueden dividir en tres subclases (Mignatti y Rifkin, 1993; Weiss, 2000; Woodhouse y cols., 1997):

- **Colagenasa intersticial:** degrada las regiones triple hélice del colágeno fibrilar tipo I, II, III, VII, VIII y X.
- **Estromelisina:** incluye a los tipos estromelisina 1, 2 y 3, así como a la matrilisina. Degradan fibronectina,

proteoglicanos, laminina y las regiones no helicoidales del colágeno IV.

- **Colagenasa tipo IV (gelatinasa):** degrada colágeno triple hélice tipos IV, V, VII, IX y X, así como fibronectina y elastina.

La actividad de las MMPs está regulada por la actividad de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), de los cuales se han identificado 4 isoformas (Engers y Gabbert, 2000). Todos los TIMPs inhiben la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 (ambas gelatinasas) mediante la formación de complejos con los enzimas activos. La asociación de los TIMPs con pro-MMPs es más específica y previene la activación enzimática. TIMP-1 se asocia exclusivamente con pro-MMP9; TIMP-2 y TIMP-4 se asocian solamente con pro-MMP-2; y TIMP-3 interacciona con ambas proenzimas (Bigg y cols., 1997; Butler y cols., 1999; Gomez y cols., 1997). Los TIMPs están implicados en otros procesos fisiológicos, además de la invasión, como por ejemplo, en la angiogénesis (Weiss, 2000).

La degradación de la membrana basal durante la invasión tumoral está restringida a regiones específicas, es decir, focalizada en las zonas de invasión local. Ello es debido a la presencia de receptores de proteinasas en la superficie celular, como el receptor de la uPA (uPAR) o de receptores de MMPs. La interacción uPA-uPAR es un requisito imprescindible para su activación (Blasi, 1993). En el caso de las MMPs, se ha

descubierto que la proteinasa de membrana MT1-MMP actúa como receptor de la forma inactiva de MMP-2, proMMP-2, siendo la interacción entre ambas moléculas necesaria para la activación de la segunda. A su vez, el receptor MT1-MMP posee actividad proteolítica sobre componentes de la matriz extracelular. Así pues, la acción coordinada del sistema formado por MT1-MMP (producida por las células tumorales) y MMP-2 (secretada por células tumorales y del estroma) proporciona un mecanismo muy eficaz para restringir la proteólisis a la zona de invasión local (Basbaum y Werb, 1996; Seiki y cols., 2003). Otras moléculas pueden actuar como receptores de MMP-2 en algunos tipos celulares, por ejemplo la integrina $\alpha\beta 3$ (receptor de vitronectina) en el melanoma. Esta última observación ofreció la primera prueba directa acerca de la interrelación entre los procesos de adhesión y degradación de la membrana basal (Brooks y cols., 1996).

El equilibrio entre los niveles de proteinasas y los inhibidores específicos también contribuye a la focalización de la proteólisis a las zonas de invasión. Así, por ejemplo, para el sistema del activador del plasminógeno existen dos inhibidores, el PAI-1 y el PAI-2.

El PAI-1 ejerce un papel esencial en la regulación de la actividad del sistema uPA-uPAR. Otro elemento de control de la proteólisis es la regulación de la expresión de MMPs, y de los componentes del sistema uPA, ejercida por una amplia

variedad de agentes secretados por las células tumorales o del estroma. Como activadores tenemos factores de crecimiento (PDGF, TGF- α , FGF básico) (Seghezzi y cols., 1996; Xu y See, 1994), citoquinas (IL-1, TNF- α) (Tran-Thang y cols., 1996) e integrinas ($\alpha\beta$ 3) (Hapke y cols., 2001). Como inhibidores actúan otros factores de crecimiento como el TGF- α y citoquinas como la IL-4 (Xu y See, 1994).

1.2.3.4. Locomoción activa

La movilidad de las células tumorales es fundamental en el proceso de invasión primaria, para alcanzar un lecho vascular, y en la colonización de un nuevo órgano. El movimiento celular generalmente es direccional tanto por quimiotaxis (gradientes de moléculas solubles) como por haptotaxis (moléculas insolubles de la matriz extracelular). Los factores que estimulan la movilidad celular pueden ser divididos en tres grupos:

El primero de ellos está constituido por factores secretados por las propias células tumorales (factores autocrinos). Por ejemplo, el factor de crecimiento hepatocitario, que normalmente actúa como un factor de crecimiento paracrino, en las células tumorales puede actuar como un factor de movilidad autocrino (Woodhouse y cols., 1997). Actúa a través de un receptor (c-met) de la familia de receptores transmembrana con actividad tirosín quinasa, expresado en la

mayoría de las células epiteliales. Otros factores dentro de este grupo son, por ejemplo, el factor de crecimiento tipo insulina II (IGF-II) o la autotaxina (Stracke y cols., 1992).

El segundo grupo engloba diferentes proteínas de la matriz que tienen la capacidad de inducir movilidad como la vitronectina, la fibronectina, la laminina, el colágeno tipo I y IV y la trombospondina. Varias de estas proteínas de la matriz estimulan la movilidad a través de receptores integrina (Woodhouse y cols., 1997).

El tercer grupo de factores de movilidad tumoral, como por ejemplo, el IGF-I, la IL-8 y la histamina, son secretados por el hospedador. Son factores de movilidad paracrinos e inducen el tránsito de las células tumorales hacia el órgano que los genera (Woodhouse y cols., 1997).

Además, la movilidad celular también puede ser regulada por otros mecanismos en estrecha conexión con los procesos de adhesión y degradación de la membrana basal. Entre ellos se encuentran el sistema uPA-uPAR, que interviene en los procesos de migración a través de mecanismos de señalización intracelular todavía poco conocidos. La actividad migratoria de este sistema puede estar mediada a través de la activación de algunas integrinas, como la $\alpha\beta 5$ (Yebra y cols., 1996). Estas observaciones, junto al hecho de que algunas integrinas actúan como receptores o activadores de la expresión de MMPs, proporcionan una conexión evidente entre

los mecanismos de adhesión, la degradación de la membrana basal y la movilidad celular.

El proceso de migración celular implica, por tanto, interacciones dinámicas de las células con su sustrato, así como una reorganización del citoesqueleto de actina donde intervienen integrinas, moléculas de matriz extracelular y componentes intracelulares. El resultado es un movimiento celular ameboide con extensión de pseudópodos y otras protusiones de membrana. A nivel molecular juegan un papel esencial ciertas proteínas de la familia Ras con actividad GTPasa, denominadas Cdc2, Rac y Rho. Estas proteínas, que pueden ser activadas por la acción de diferentes factores de crecimiento y por fosfolípidos, participan en la reorganización de las interacciones integrinas-citoesqueleto de actina.

1.2.4. Diseminación de las células tumorales. Concepto de metástasis

El término metástasis deriva del griego “methistemi” (Weiss, 2000) y engloba a un conjunto de procesos mediante los cuales las células tumorales diseminan desde un tumor primario a órganos distantes sin conexión anatómica directa, a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos, dando lugar a nuevas colonias o tumores secundarios. El cáncer es una de las causas más frecuentes de mortalidad. A pesar de los

avances en el diagnóstico, técnicas quirúrgicas, cuidados de los pacientes y tratamiento de las enfermedades neoplásicas, las metástasis constituyen la principal causa de mortalidad en los pacientes oncológicos. En el momento del diagnóstico de un tumor maligno, las células cancerosas pueden estar diseminadas en el organismo (Fidler, 1984; Schabel, 1975; Sugarbaker y Ketcham, 1977). Esto hace su tratamiento más complejo y empeora el pronóstico clínico. El proceso metastásico se ha estudiado durante más de 100 años, sin embargo sólo los recientes descubrimientos sobre la biología molecular y celular, implicados en la patogénesis de las metástasis, han permitido avances sustanciales.

El principal obstáculo para el tratamiento de las metástasis es la heterogeneidad biológica de las células cancerosas, tanto en el tumor primario como en el secundario, debido a su inestabilidad genómica y fenotípica (Fidler y Hart, 1982). Los tumores malignos están formados por diferentes subpoblaciones celulares, lo cual aumenta la probabilidad de que alguna de ellas sea capaz de evadir las barreras naturales (físicas, metabólicas, inmunes, etc.) y formar un tumor secundario. Además de esta inestabilidad, el microambiente específico de cada órgano puede modificar la respuesta de una célula tumoral metastásica a la terapia (Fidler, 2003).

Las necesidades y funciones que han de satisfacer las distintas células tumorales para culminar con éxito el proceso

metastático son muy similares, sin embargo, los procesos moleculares y genéticos pueden variar enormemente entre tumores. Esta diversidad implica que en la regulación del proceso metastático intervienen factores dependientes del tumor y del órgano donde se produce. Además, existe intercomunicación entre las células tumorales y los órganos invadidos. Por lo tanto, se asume que la formación de metástasis no es aleatoria (Hart y Fidler, 1980). Por todo ello, no resulta conveniente hablar de un mecanismo patogénico único en el proceso de metastasis, y parece más aconsejable estudiar en cada órgano los elementos microambientales, celulares y moleculares que regulan las metástasis de cada tipo tumoral.

Los vasos sanguíneos y linfáticos son las vías anatómicas naturales para la diseminación de las células tumorales desde un tumor primario a un órgano distante. Se ha observado como en algunos tumores las células migran hacia los vasos sanguíneos bajo estímulos quimiotácticos que difunden desde la sangre, o que son secretados por los macrófagos. Este hecho, puede aumentar la eficiencia de la intravasación tumoral (Condeelis y Segall, 2003).

Una vez alcanzado el torrente circulatorio las células deben, en primer lugar, resistir el ataque del sistema inmune, bien ocultándose al formar pequeños paquetes de células tumorales (un mecanismo favorecido por la acción hemostática de las

plaquetas y las proteínas de la coagulación) (Gasic, 1984); o bien por agregación simple entre células tumorales (Fidler, 1973a). Posteriormente, para que exista extravasación y formación de un tumor secundario, debe existir retención de las células tumorales en capilares, en el caso de células aisladas; o en vasos de mayor calibre, en el caso de agregados celulares (Liotta y cols., 1976a). Se ha observado como los émbolos multicelulares son más eficientes para la formación de metástasis que las células aisladas (Liotta y cols., 1976b; Luzzi y cols., 1998).

Las células tumorales, aisladas o agregadas, pueden quedar retenidas por una restricción de tamaño en el primer lecho vascular que muestre un diámetro inferior al de las células tumorales. En el caso de la sangre procedente de la mayoría de tejidos este lecho vascular es el pulmonar, mientras que la procedente de los intestinos pasa primero por la microvascularización hepática. Por ello pulmones e hígado constituyen asiento habitual de metástasis. La retención física en los capilares explicaría la agregación homotípica de las células tumorales (Fidler, 1973a).

La retención pasiva debida a condicionantes mecánicos constituye el principal postulado de la Teoría hemodinámica de Ewing (1928). Sin embargo, esta hipótesis no explica la órgano-especificidad inicial observada en algunos tipos de cánceres (Nicolson, 1988).

La primera teoría que contempló esta organo-especificidad metastática fue enunciada por Paget en 1889. Al estudiar las autopsias de mujeres que habían fallecido por cáncer de mama, concluyó que el crecimiento metastático sólo ocurría cuando determinadas células tumorales (“seed”, semilla) tenían una especial afinidad por ciertos órganos (“soil”, suelo). Así pues, la formación de la metástasis dependería de la interacción de las células adecuadas con un ambiente tisular compatible.

Ambas hipótesis no son excluyentes, sino que, probablemente, constituyen parte de un único fenómeno. Tras una retención mecánica en el endotelio vascular, la expresión de moléculas de adhesión, por parte de las células tumorales y endoteliales, debe tener un importante papel selectivo (Orr y cols., 2000; Glinsky y cols., 2003;).

Aunque el concepto de diseminación tumoral intravascular clásico está ampliamente extendido, existen otros modelos de diseminación. Se ha observado, primero en un tumor mamario murino (Sugino y cols., 2002) y posteriormente en 10 tipos de tumores humanos (Sugino y cols., 2004), como grupos de células tumorales son capaces de rodearse de células endoteliales, sin atravesar la pared vascular, formando nuevos vasos por donde proliferaran. A este modelo se le ha denominado por sus autores como invasión independiente de metástasis. También se ha observado en estudios *in vivo* e *in*

vitro como células de melanoma son capaces de migrar a lo largo de la superficie endotelial extravascular. A este modelo se le ha llamado metástasis migratoria extravascular (Lugassy y cols., 2004).

1.2.4.1. Importancia de la interacción entre endotelio y células tumorales en la distribución de metástasis

La idea de que la unión entre las células tumorales y las endoteliales es un paso crítico en la cascada metastática se encuentra ampliamente arraigada en la comunidad científica. Un factor que sin duda contribuye a la órgano-especificidad metastática es la interacción específica entre células tumorales y endoteliales y/o subendoteliales, tal y como demuestran estudios realizados sobre las diferencias antigénicas entre distintas partes de vasos sanguíneos y en diversos órganos (Auerbach y cols., 1985).

Tras su inyección intravenosa se ha observado una distribución uniforme inicial de células metastáticas de melanoma murino B16-F10 (B16M-F10) en el pulmón. Con el paso del tiempo, estas células de melanoma dan lugar a tumores secundarios de localización selectiva (Cameron y cols., 2000).

Las células tumorales pueden inducir la retracción endotelial para poder adherirse a las moléculas que conforman la matriz extracelular subyacente. Esta matriz extracelular puede influir

indirectamente en la adhesión de células tumorales al endotelio, puesto que algunos de sus componentes órgano-específicos pueden modular la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial. Pauli y Lee demostraron que las células endoteliales de aorta cultivadas sobre matrices extraídas de hígado y pulmón constituían un sustrato inmejorable para la adhesión de células tumorales que preferentemente metastatizaban en un órgano u otro (Pauli y Lee, 1988).

Esto sugiere que la expresión de moléculas órgano-específicas por parte de las células endoteliales, no constituye únicamente una característica de estas células en cada órgano, sino que puede estar regulada por la composición de la matriz extracelular donde se encuentran.

1.2.4.2. Moléculas implicadas en la unión célula tumoral-endotelio

La caracterización celular y molecular del proceso que conduce al reclutamiento de los leucocitos en los lugares de inflamación (Carlos y Harlan, 1994; Mackay y Imhof, 1993; Raud y Lindbom, 1993) ha servido de gran ayuda para entender la diseminación tumoral. Este proceso comparte muchos aspectos con el metastático (Nicolson, 1988), e incluso coopera con éste. Esta hipótesis ha sido ampliamente demostrada en

los últimos años, relacionando moléculas implicadas en procesos fisiológicos, como el asentamiento leucocitario, con la adhesión tumoral al endotelio.

Selectinas, integrinas, cadherinas y proteínas de la superfamilia inmunoglobulina, así como moléculas sin clasificar, facilitan la unión entre las células tumorales y las endoteliales. Algunas de estas moléculas tienen una expresión constitutiva y además parecen tener una órgano-especificidad en su distribución (Pauli y cols., 1990; Pauli y Lee, 1988). Otras son inducibles por señales moleculares como p.e. citoquinas o radicales libres. Dichas señales inducen contactos iniciales entre las células endoteliales y tumorales, “docking”, por medio de un reconocimiento p.e. proteína-proteína, proteína-ácido nucleico. Esto inicia la activación de las células endoteliales y tumorales a través de la liberación de citoquinas, radicales libres, lípidos activos y factores de crecimiento. Estas moléculas son capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión en ambos tipos celulares, de forma que la unión se hace más firme, “locking” (Orr y cols., 2000). Posteriormente, la transducción de señales producirá una retracción celular, locomoción activa y extravasación de las células tumorales.

Algunas moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, selectina E) apenas se expresan en condiciones normales. Citoquinas como la IL-1, el TNF- α o el interferón γ (IFN- γ) son los principales estímulos para su expresión (Bevilacqua y cols.,

1989; Marlin y Springer, 1987; Osborn y cols., 1989). Otras moléculas, como la selectina P, se expresan constitutivamente en las células, se almacenan en gránulos intracelulares y se traslocan a la superficie gracias a estímulos externos tales como la trombina, los radicales libres del oxígeno y los ésteres de forbol. Las integrinas, son fundamentalmente receptores de membrana, algunos reconocen fibronectina o laminina, que son componentes mayoritarios de la matriz. Unas pueden ser específicas para una sola molécula, pero en cambio hay otras que pueden reconocer diferentes ligandos.

Son muchas las analogías existentes entre las interacciones de células tumorales y leucocitarias con el endotelio vascular, por ejemplo: la exposición a IL-1 α y TNF- α induce la expresión de VCAM-1 en células endoteliales, esto favorece la unión de las células leucocitarias o tumorales a las endoteliales (Fox-Robichaud y Kubes, 2000; Okahara y cols., 1994; Sturm y cols., 2003); la velocidad de flujo sanguíneo puede ser importante para ambos tipos celulares en su unión al endotelio (Weiss y cols., 1985); la expresión de selectina E por parte de las células endoteliales promueve la adhesión de neutrófilos, linfocitos, monocitos y de células tumorales (Brodt y cols., 1997; Godin y cols., 1993).

Una de las estirpes tumorales que utiliza moléculas del sistema de interacción endotelio-leucocito es el melanoma. En 1988 se observó por primera vez, un incremento en la adhesión de

células de melanoma humano a células endoteliales activadas por citoquinas (Rice y cols., 1988). Este incremento en la adhesión del melanoma se correlacionó con una sobreexpresión de moléculas ICAM-1 (Rice y Bevilacqua, 1989). Por otra parte, se demostró mediante estudios *in vitro*, cómo células de melanoma humano metastásico que expresan ICAM-1 de forma constitutiva, secretaban altas cantidades de IL-1 (Burrows y cols., 1991). Esta citoquina incrementa de manera autocrina la expresión de ICAM-1 tumoral, y de modo paracrino en las células endoteliales la expresión de ICAM-1, selectina E y VCAM-1. Ninguno de los anticuerpos utilizados contra estas CAMs inhibió la adhesión tumoral de estos melanomas al endotelio. Sin embargo, la adhesión tumoral se inhibió cerca del 50% utilizando un anticuerpo policlonal anti β 1, β 2 y β 3 (Burrows y cols., 1991), lo cual sugiere que la adhesión de células tumorales al endotelio podría estar mediada, en parte, por una integrina presente en las células tumorales. Trabajos posteriores apoyan el papel de esta integrina en la adhesión tumoral al endotelio (Chang y cols., 1992; Honn y cols., 1988; Honn y Tang, 1992). En este sentido, se ha observado que las células tumorales activadas por el ácido 12(S)-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico o con el éster de forbol tetradecanoil-forbol acetato muestran un aumento en la adhesión a las células endoteliales microvasculares, a la matriz subendotelial intacta o a la fibronectina (Honn y cols., 1988), pudiéndose inhibir esta adhesión mediante inhibidores de la

lipooxigenasa, o con anticuerpos contra las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Estos resultados implican que la adhesión de células tumorales mediada por estas integrinas requiere la activación del endotelio (Honn y Tang, 1992; Tang y cols., 1994).

Se ha demostrado que otra integrina, la VLA-4 (antígeno de expresión muy tardía 4) expresada en las células de melanoma, está involucrada en la interacción *in vivo* con la VCAM-1 expresada en las células endoteliales activadas por TNF- α (Okahara y cols., 1994) y por IL-1 (Garofalo y cols., 1995; Martin-Padur y cols., 1991). Orosz y colaboradores han demostrado que la adhesión de células de linfoma a células de endotelioma se inhibe con anticuerpos que interfieren la interacción de VCAM-1 con VLA-4 (Orosz y cols., 1995).

Así pues, estudiadas todas las similitudes encontradas en la interacción existente entre las células endoteliales con los leucocitos y las células tumorales, se postuló que la adhesión entre las células tumorales y endoteliales debía seguir el modelo “rolling along” establecido para la unión con leucocitos.

1.2.5. Formación de metástasis e ineficiencia metastática

Únicamente una pequeña proporción de células tumorales tiene capacidad de formar tumores secundarios en órganos distantes. Este hecho se denomina “ineficiencia metastática” (Liotta y cols., 1974; Weiss, 1990). En los últimos años se han

analizado, en diferentes modelos animales, las diferentes causas que dan lugar a que sólo unas pocas células, de las que salen al torrente circulatorio y alcanzan órganos distantes, sean capaces extravasarse y proliferar.

Fidler y Nicolson observaron en un modelo murino que, aproximadamente, el 85% de las células B16M retenidas en la microvascularización pulmonar, habían sido destruidas 24 horas después de su inoculación (Fidler y Nicolson, 1977). Posteriores observaciones en diferentes tumores humanos y animales, indicaron que un gran número de las células circulantes eran destruidas en la microcirculación por el ataque del sistema inmunitario y la presión que sufren las células al ser retenidas en los capilares. La combinación de los datos anatómicos, hemodinámicos e inmunológicos llevó a pensar que estas eran las causas de la ineficiencia metastática (Weiss y cols., 1985). Takaoka y colaboradores observaron como la sobreexpresión de Bcl-2 en células B16M potenciaba la aparición de metástasis pulmonares, pero no examinaron el efecto de la Bcl-2 sobre la apoptosis *in vivo* (Takaoka y cols., 1997). En trabajos posteriores se ha observado como la apoptosis puede ser una de las causas de la ineficiencia metastática (Wong y cols., 2001). Además, la capacidad de las células tumorales para extravasarse al tejido circundante degradando la membrana basal y la matriz extracelular también se ha considerado como un paso limitante en el proceso de

metástasis (Weiss, 1990). Como se ha observado en diferentes tipos celulares, la capacidad de extravasación no es directamente proporcional a la capacidad metastática. Por ejemplo, los fibroblastos (NIH 3T3), a pesar de su baja actividad metastática tienen la capacidad de extravasarse como fibroblastos transformados con el oncogen ras (Koop y cols., 1996). Por ello, la ineficiencia metastática se ha atribuido, en parte, a la incapacidad de las células a crecer tras la extravasación (MacDonald y cols., 2002).

En el concepto de ineficiencia metastática hay que incluir las células tumorales durmientes. Son células tumorales que han abandonado el tumor primario y se detectan como células extravasadas quiescentes sin una progresión clínica aparente. Se incluyen dentro del concepto de ineficiencia metastática por que se han identificado como: a) células solitarias sin capacidad, al menos en etapas tempranas, de proliferar hasta formar tumores macroscópicos y b) resistentes a la apoptosis (Luzzi y cols., 1998). Se ha observado como algunos tumores primarios son capaces de inhibir el crecimiento de las metástasis liberando mediadores antiangiogénicos (O'Reilly y cols., 1997; O'Reilly y cols., 1994; Guba y cols., 2001). Proteínas antiangiogénicas, como la endostatina y la angiostatina, mantienen al tumor circunscrito a un mínimo tamaño crítico, mediante un balance de proliferación y apoptosis. Durante ese periodo el aporte de nutrientes es por

difusión, hasta que una angiogénesis activa permite un aumento de la masa tumoral (O'Reilly y cols., 1996).

2. RADICALES LIBRES Y CÁNCER

2.1. Especies reactivas del oxígeno. Generalidades

El oxígeno es esencial para los organismos aerobios. Sin embargo, puede resultar tóxico suministrado en concentraciones elevadas. Aunque inicialmente se pensó que la toxicidad del O₂ se debía a que inactivaba directamente las enzimas celulares, posteriormente Gerschman y Gilbert propusieron que los efectos nocivos del O₂ eran causadas por radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que se originaban a partir de él (Gilbert y cols, 1964). Esta hipótesis fue desarrollada y aceptada totalmente cuando se descubrió la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido (O₂^{-•}) para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Fridovich, 1975).

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos, entendiéndose como electrón desapareado el que ocupa por sí mismo un único orbital atómico o molecular. Como

consecuencia, estas especies químicas son extremadamente reactivas y, por tanto, tienen una semivida corta y una concentración muy baja (Prior, 1986; Cadenas 1989).

En la química de los radicales libres podemos distinguir 3 etapas:

- **Iniciación**, en la que una especie no radicalaria adquiere ese carácter bien ganando o perdiendo un electrón o bien por ruptura homolítica a partir de un enlace covalente.
- **Propagación**, en la que un radical reacciona con una especie no radicalaria y esta última adquiere ese carácter, con lo que la reacción radicalaria se perpetúa.
- **Terminación**, en la que reaccionan dos radicales para formar especies estables.

La molécula de O_2 puede ser calificada de birradical, puesto que tiene un electrón desapareado en cada uno de sus orbitales externos antienlazantes Π^* . Sin embargo, la reactividad de esta molécula es baja porque los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Esta característica le permite ser un buen oxidante (capta electrones de las moléculas que oxida).

Las ROS pueden formarse a partir del oxígeno molecular por reacciones de óxido-reducción, o bien por absorción de energía

electromagnética. Una de las formas reactivas del O₂ que se genera de este último modo es el oxígeno singlete (¹O₂). Su estado excitado presenta un excedente de energía con respecto al O₂ de 22.4 Kcal. El ¹O₂ es más reactivo que éste y tiene una vida media muy corta (5x10⁻⁶ segundos). No se trata de un radical, pues carece de electrones desapareados al compartir los dos electrones un mismo orbital. Se genera por un aporte extra de energía a la molécula de O₂.

Cuando un electrón reduce la molécula de O₂, se produce el radical superóxido (O₂^{-•}), una especie muy reactiva con un único electrón desapareado.

La adición de dos electrones y dos protones genera H₂O₂, que no es propiamente un radical, al carecer de electrones desapareados pero sin embargo es un oxidante y por tanto, lo debemos incluir en las ROS. Además, en presencia de metales pesados puede ser una fuente del radical hidroxilo (OH[•]), una de las ROS más tóxicas para los sistemas biológicos pero con una semivida y radio de acción cortos (Prior, 1986; Prior y Church, 1991).

La trirreducción del O₂, con tres electrones, daría lugar al radical OH[•], aunque en la práctica no es posible. Sin embargo, si que puede aparecer en los sistemas biológicos como consecuencia de distintos procesos. En primer lugar, puede formarse por radiolisis del agua (Adams y cols, 1968), por acción de la radiación gamma o de los rayos X. A nivel

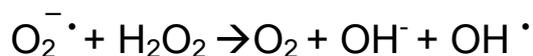
biológico, uno de los procesos más importantes de producción de radicales OH^\bullet es la reducción del H_2O_2 por iones metálicos, en especial en ión ferroso (Fe^{++}). La mezcla de H_2O_2 y Fe^{++} se conoce como *reacción de Fenton*, quien indicó que esta mezcla era capaz de oxidar al ácido tartárico (Fenton, 1894). Posteriormente, Haber y Weiss (1934) propusieron el siguiente mecanismo de formación de radicales libres (figura 1):

Figura 1: Reacción de Haber-Weiss (1934)

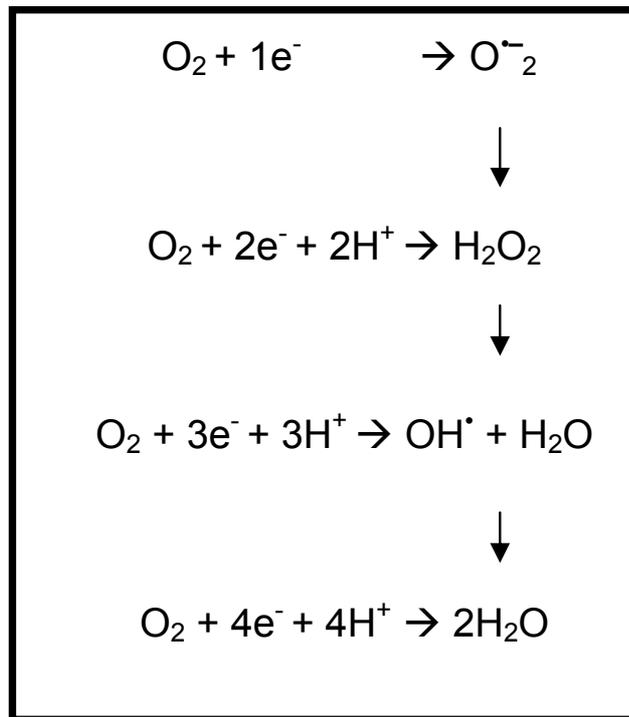


Debemos tener en cuenta que la formación del radical superóxido puede llevar a la formación del radical OH^\bullet (figura 2).

Figura 2: Formación radical OH^\bullet



Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular con cuatro protones origina dos moléculas de H_2O (figura 3).

Figura 3: Reducción secuencial y univalente del O₂ (Salin, 1988)

Los sistemas enzimáticos antioxidantes han evolucionado paralelamente a este metabolismo aerobio para contrarrestar el daño oxidativo causado por las ROS. A pesar de esta defensa antioxidante, se pueden producir daños sobre biomoléculas, un hecho implicado en la fisiopatología de enfermedades como la arteriosclerosis, la artritis, la fibrosis pulmonar, las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (Ames y cols, 1993; Halliwell y cols, 1992) .

Las ROS tienen capacidad de producir efectos citotóxicos, aunque, va cobrando una mayor importancia su función en la señalización celular tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas.

La acción de las ROS puede variar notablemente, dando lugar a resultados aparentemente contradictorios. Por ejemplo, las ROS participan en la estimulación del crecimiento celular (Burdon, 1995; Burdon y cols, 1995) y también en la apoptosis (Slater y cols, 1995b). La acción de las ROS en las células depende de diferentes factores como pueden ser su concentración (Burdon y cols, 1995), el tipo celular y su estado metabólico, una combinación de los factores anteriores, o factores aún desconocidos. En un reciente estudio, se observó como células sometidas a un estímulo oxidativo eran capaces de activar señales específicas, para morir o tolerar la agresión, dentro de la primera hora tras el estímulo (Nair y cols, 2004).

2.1.1. Formación de ROS en los sistemas biológicos

Las especies reactivas de oxígeno se están produciendo continuamente en los sistemas biológicos. Muchas de ellas son productos intermedios en diferentes reacciones enzimáticas y algunas resultan beneficiosas para el organismo. Por ejemplo, la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa están implicadas en la destrucción fagocítica de bacterias mediante la producción de $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} y 1O_2 (Southorn y Powis, 1988; Chanock y cols, 1994). De manera general, sin embargo, cuando hay una hiperproducción de estos radicales libres, o bien cuando los sistemas de defensa antioxidante están deteriorados, las ROS

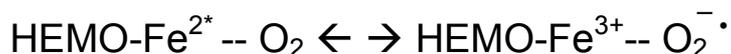
provocan grandes daños celulares (Valenzuela y Videla, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.1.1.1. Autooxidación de pequeñas moléculas

Diferentes moléculas citoplasmáticas pueden producir ROS cuando se autooxidan. En todos los casos, se produce como radical primario el $O_2^{\cdot-}$ que, por una reacción de dismutación espontánea o enzimática, genera H_2O_2 . Cuando esas moléculas oxidadas se vuelven a reducir, se establece un ciclo redox que puede implicar un consumo desproporcionado de O_2 y equivalentes redox. Entre esas moléculas se encuentran iones divalentes, tioles, quinonas, catecolaminas, terahidropterinas o flavinas (Freeman y Grapo, 1982; Proctor y Reynolds, 1984).

2.1.1.2. Oxidación de la hemoglobina y mioglobina

La oxidación de estas hemoproteínas puede producir ROS. El hierro de la hemoglobina y de la mioglobina, cuando liga O_2 está en forma ferrosa, pero existe una cierta deslocalización electrónica, de manera que se produce el equilibrio siguiente (figura 4):

Figura 4: Equilibrio electrónico entre Fe²⁺ y Fe³⁺ en la hemoglobina

Es posible que la molécula de hemoglobina oxigenada se descomponga y dé lugar a O₂^{·-} y hemo-Fe³⁺. En ese punto la hemoglobina, ya metahemoglobina, no puede transportar O₂. Normalmente sólo una baja proporción de oxihemoglobina es transformada en metahemoglobina gracias a las metahemoglobina reductasas (Valenzuela y Videla, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.1.1.3. Actividad de las enzimas

Diversas enzimas generan ROS durante sus ciclos catalíticos. Entre ellas se encuentran la dihidroorotato deshidrogenada, la triptófano dioxigenasa, la aldehído oxidasa, la monoaminoxidasa, xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa o la NADPH oxidasa. En algunos casos, los radicales libres que se forman inactivan a las enzimas que los originan, y de esta forma regulan la ruta metabólica en la que participan. (Sies, 1985; Southorn y Powis, 1988; Greene y Paller, 1992).

2.1.1.4. Peroxisomas

Se ha comprobado que los compuestos que estimulan la proliferación de los peroxisomas inducen al estrés oxidativo. Estos orgánulos tienen una gran capacidad para producir H_2O_2 debido a la elevada concentración de oxidasas que contienen. Algunos ejemplos son: las L y D-aminoácido oxidasas. Estas enzimas catalizan la reducción divalente del O_2 sin formación de $O_2^{\cdot-}$. La oxidación peroxisómica de ácidos grasos también genera H_2O_2 como subproducto (Southorn y Powis, 1988; Del Río y cols, 1992)

2.1.1.5. Transporte electrónico mitocondrial

El sistema de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente $O_2^{\cdot-}$. La citocromo oxidasa cataliza la reducción del O_2 con cuatro electrones y cuatro protones para dar dos moléculas de H_2O_2 . La estructura molecular de este complejo proteico impide la liberación de ROS. Sin embargo, cuando la cadena respiratoria está muy reducida y la concentración de ADP es limitante, otros componentes de la cadena respiratoria sí pueden perder electrones durante su transferencia y generar $O_2^{\cdot-}$. La formación de ROS durante el transporte electrónico mitocondrial se ve favorecida por elevadas concentraciones de O_2 . (Reed, 1997; Beckman y Ames, 1998).

2.1.1.6. Transporte electrónico microsomal

Las fracciones microsomales liberan $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 cuando se incuban con NADPH. El citocromo P_{450} es en realidad, un conjunto de citocromos localizados en el retículo endoplásmico y otros orgánulos. Estos citocromos están implicados en la oxidación de sustratos a expensas del O_2 , uno de cuyos átomos se une al sustrato y el otro forma H_2O . En la reacción se requiere poder reductor, normalmente, aportado por el NADPH a través de la flavoproteína, NADPH-citocromo P_{450} reductasa. Cuando se desacopla el ciclo catalítico del P_{450} , el flujo de electrones se desvía al O_2 , que se convierte en $O_2^{\cdot-}$ en lugar de unirse al sustrato. La autooxidación de la NADPH-citocromo P_{450} reductasa también puede originar $O_2^{\cdot-}$ (Sevanian y cols, 1990; Beckman y Ames, 1998).

El citocromo b_3 es una hemoproteína del sistema de transporte electrónico microsomal responsable de la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos. Los electrones se transfieren desde el NADH o NADPH al citocromo b_5 , el cual los cede a la desaturasa. Finalmente esta proteína oxida al ácido graso con O_2 y forma H_2O . Por causas desconocidas, es posible que el citocromo b_5 y la flavoproteína cedan electrones al O_2 y generen $O_2^{\cdot-}$ (Freeman y Grapo, 1982; Valenzuela y Videla, 1989).

2.1.1.7. Fuentes exógenas

Además de los sistemas intracelulares descritos anteriormente, existen fuentes exógenas de ROS. La radiación ionizante, la radiación ultravioleta o la luz visible en presencia de fotosensibilizadores pueden dar lugar a radicales libres. La formación de radicales libres también está implicada en la toxicidad de una amplia variedad de xenobióticos. Muchos de estos compuestos químicos ejercen su acción tóxica mediante su activación metabólica a productos intermedios reactivos que son radicales libres. Entre estos compuestos se encuentran p.e. pesticidas, el humo del tabaco, antimicrobianos o fármacos anticancerígenos y otros medicamentos (Martinez-Cayuela, 1998).

2.1.2. Mecanismos de acción de los radicales libres: mutagénesis

En el inicio de la formación tumoral se requiere una alteración permanente del material genético. Las ROS pueden producir diferentes efectos sobre el DNA, donde se han identificado: roturas tanto simples como de doble hebra, modificaciones en las bases púricas, pirimidínicas y en la desoxirribosa, y por último, entrecruzamientos en el DNA (Cheeseman y Slater, 1993; Klaunig y Kamendulis, 2004). Aunque las bases pueden ser oxidadas por diferentes ROS, el OH[•] es el que mayores

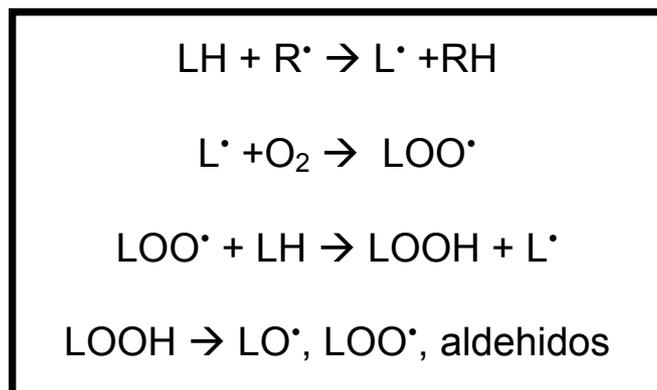
lesiones confiere al DNA, ya que puede reaccionar con todos sus componentes. La alteración química de las moléculas de desoxirribosa puede producir la pérdida de bases de purina o pirimidina, originándose locus mutagénicos *in vivo* (Loeb, 1985).

Algunos de los productos más importantes que se forman por ataque del OH[•] sobre las bases púricas del DNA son la 8-hidroxi-guanosina (8-OH-G) o la 5-formamido-4,6-diamino-pirimidina. Ejemplos de productos derivados de las pirimidinas son el tiamino glicol y la 5-hidroxi-citosina (Halliwell y Aruoma, 1991).

La mayoría de estas modificaciones en las bases se traducen en un bloqueo de la replicación. En algunas ocasiones, debido a errores de lectura en la replicación, pueden dar lugar a mutaciones puntuales. La lesión oxidativa más frecuente en las bases del DNA es la formación de 8-OH-G, por oxidación del C8 de la guanina, lo cual ocurre en aproximadamente uno de cada 10⁵ residuos de guanina en una célula humana normal (Kasai y cols, 1986). La 8-OH-G puede producir un cambio del apareamiento GC por TA debido al apareamiento erróneo 8-OH-G-A. Esta mutación se ha detectado frecuentemente en el oncogén Ras (Bos, 1998), y representa un posible mecanismo de tumorigénesis por ROS. También se ha detectado en el gen supresor de tumores P53 o en cánceres de hígado y pulmón (Hsum y cols, 1991; Takahashi y cols, 1989).

También se ha observado daño oxidativo en el DNA mitocondrial (mtDNA) asociado a la carcinogénesis (Cavalli y Liang, 1998). Mutaciones en el mtDNA y alteraciones en la función genómica parecen estar relacionados con el desarrollo de distintos tumores (Horton y cols, 1996; Tamura y cols, 1999). Las bases del mtDNA son más susceptibles al daño oxidativo que las del nuclear (Zastawny y cols, 1998). Y a ello contribuyen tres factores: el mtDNA se encuentra muy próximo a la mayor fuente generadora de ROS, la cadena de transporte de electrones; el mtDNA no está protegido por histonas y; la capacidad de reparación del mtDNA es limitada (Klaunig y Kamendulis, 2004). Todo ello facilita la acumulación de 8-OH-G.

Las membranas celulares, al estar formadas por ácidos grasos polinsaturados (PUFA), son seguramente las biomoléculas más susceptibles al ataque de las ROS. La destrucción oxidativa de los PUFA es conocida como peroxidación lipídica y tiene la peculiaridad de ser capaz de automantenerse. El mecanismo general de peroxidación lipídica puede resumirse de la siguiente manera (figura 5):

Figura 5: Peroxidación lipídica

Donde LH es un PUFA y R[•] es el radical oxidante. El ataque oxidativo a los PUFA genera un radical alquílico ácido graso (L[•]) que rápidamente reacciona con el O₂ formando el radical peróxido ácido graso (LOO[•]). Los LOO[•] tienen la capacidad de oxidar nuevas moléculas de PUFA generando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y L[•]. Los LOOH pueden originar más especies radicalarias y ampliar el rango de compuestos, sobre todo a aldehídos (Cheeseman y Slater, 1993).

Estos productos resultantes del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se encuentran hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehidos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron, causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis.

Además, los productos finales de la peroxidación lipídica, como el 4-hidroxinonenal y el malonildialdehído (MDA), estimulan la síntesis de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Hashimoto y cols, 1999).

2.1.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo

Los organismos aerobios poseen mecanismos para neutralizar los radicales libres que, en pequeñas cantidades, se están produciendo continuamente en el metabolismo. La citocromo oxidasa del sistema de transporte electrónico mitocondrial actúa como sumidero retirando el oxígeno que, de otra manera, podría ser convertido en ROS. Pero las células disponen, además, de complejos sistemas enzimáticos y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo originado por elevadas concentraciones de radicales libres. Los sistemas de defensa antioxidante primarios o preventivos disminuyen la velocidad de inicio de las reacciones de los radicales libres al disminuir sus concentraciones. Los sistemas de defensa antioxidante secundarios atrapan los radicales propagadores, deteniendo su efecto nocivo en las etapas iniciales.

2.1.3.1. Sistemas de defensa primarios

2.1.3.1.1. Enzimas

- **Superóxido dismutasa (SOD)**

Son las principales enzimas implicadas en la desintoxicación de las ROS. Catalizan la reacción de dismutación de $O_2^{\cdot-}$ generando H_2O_2 y O_2 .

La velocidad de dismutación enzimática es 10^4 veces mayor que la dismutación química. Las superóxido dismutasas son una familia de metaloproteínas que tienen diferentes cofactores metálicos. La CuZnSOD es la isoenzima prevalente, mayoritaria en el citosol de las células eucarióticas, y también detectable en el núcleo. La MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial de eucariotas y procariotas protegiendo contra el $O_2^{\cdot-}$ producido durante el transporte electrónico mitocondrial. La FeSOD ha sido aislada en plantas y procariotas. Por último, una SOD extracelular que contiene cobre ha sido identificada también en un gran número de tejidos animales (Fridovich, 1975; Marklund, 1984; Harris, 1992). Una actividad SOD excesiva ha de ir acompañada de actividad catalasa y/o glutatión peroxidasa, ya que, si no es así, se acumula H_2O_2 y, por tanto, aumenta $OH\cdot$.

- **Catalasa**

Es una hemoproteína que cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 (figura 6):

Figura 6: Reacción mediada por catalasa



Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero presenta una baja afinidad por el sustrato, por lo que resulta fundamental cuando el H_2O_2 se encuentra en altas

concentraciones. La mayor parte de las células contienen catalasa, y en las eucariotas está localizada principalmente en los peroxisomas (Proctor y Reynolds, 1984; Blake y cols, 1987; Harris, 1992).

- **Glutation peroxidasa dependiente de selenio (SeGPx)**

Esta proteína es un miembro de la familia de las peroxidases y cataliza la reducción del H₂O₂ o de peróxidos orgánicos empleando el GSH como cosustrato. Tiene cuatro átomos de Se que le confieren su capacidad catalítica (figura 7):

Figura 7: Reacción mediada por la SeGPx



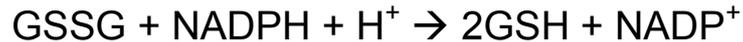
A diferencia de la catalasa, tiene alta actividad por sus sustratos. Esta enzima está localizada en el citosol de las células eucarióticas, y es detectable en las mitocondrias (Cotgreave y cols, 1988; Spalholz y Bylan, 1991; Harris, 1992).

- **Glutación reductasa (GR)**

Cataliza la reducción del (GSSG) utilizando equivalentes redox en forma de NADPH. Esta proteína tiene una distribución similar a la de la SeGPx (figura 8). Su localización subcelular

es, citosólica y mitocondrial (Proctor y Reynolds, 1984; Cotgreave y cols, 1988).

Figura 8: Reacción mediada por la GR



- **Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)**

La reacción de esta enzima permite la regeneración del NADPH oxidado por la GR (Halliwell y Gutteridge, 1999) (figura 9).

Figura 9: Reacción mediada por G6PDH



- **Otras enzimas**

La NADPH: quinona oxidoreductasa (DT-diaforasa) y la epóxido hidrolasa son dos ejemplos. La primera reduce mediante dos electrones muchas quinonas y la segunda reacciona con diferentes especies epóxido disminuyendo su concentración (Moody y Silveira, 1986; Lind y cols, 1990).

2.1.3.1.2. Secuestradores no enzimáticos

Las enzimas descritas constituyen la primera línea de defensa celular frente a los daños oxidativos. En general, funcionan eliminando $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 antes de que interactúen para formar el radical OH^{\cdot} . Pero existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos. Estas moléculas secuestran sin intervención enzimática los radicales libres residuales que escapan de las enzimas antioxidantes.

- **Glutation**

El GSH está presente, a altas concentraciones, aunque con importantes diferencias intercelulares, en la mayoría de las células procariotas y eucarióticas. Esta molécula puede interaccionar con las ROS de distintas maneras:

Puede oxidarse reduciendo H_2O_2 u otros peróxidos vía SeGPx.

Puede reaccionar directamente con radicales libres como $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} o OR^{\cdot} generando el radical tiilo (GS^{\cdot}) y posteriormente el GSSG.

Puede reaccionar con ciertos compuestos electrófilos para formar aductos covalentes. En estas últimas reacciones intervienen las glutatión-S-transferasas (GSht) (Meister y Anderson, 1983; Shan y cols, 1990).

- **Vitamina C**

La vitamina C o ácido ascórbico es una molécula hidrosoluble que se encuentra, intra o extracelularmente, en la mayor parte de los sistemas biológicos. Reacciona directamente con los radicales libres y se convierte en ácido dehidroascórbico, éste se regenera vía dehidroascorbato reductasa utilizando GSH. Otra función importante de ácido ascórbico es restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Rose, 1990; Frei, 1991; Stahl y Sies, 1997).

- **Acido úrico**

El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas en mamíferos (humanos y primates), insectos, reptiles y aves, que no tienen uricasa.

Este compuesto es un antioxidante importante capaz de atrapar diversos tipos de radicales libres cuando están en un medio acuoso. Además, se ha comprobado que protege frente a la oxidación del ácido ascórbico en el plasma sanguíneo (Sevanian y cols, 1985; Davies y cols, 1986)

- **Taurina**

Este β -aminoácido se ha encontrado en la mayoría de las células eucarióticas y también en una gran variedad de fluidos extracelulares. La taurina reacciona directamente con algunos

oxidantes como el ácido hipocloroso, para formar especies menos reactivas (Valenzuela y Videla, 1989).

- **Proteínas**

Como hemos descrito anteriormente, las reacciones tipo Fenton, en las que se generan radicales libres extremadamente nocivos, están catalizadas por metales de transición. Por tanto, todas las proteínas que disminuyen los niveles de iones metálicos libres, como Fe^{2+} y Cu^{2+} , pueden ser incluidas dentro de los sistemas de defensa antioxidante. La transferrina y la lactoferrina son glucoproteínas que ligan hierro y lo transportan en la circulación sanguínea. La ferritina almacena este metal intracelularmente (Thurnham, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1999). La ceruloplasmina secuestra iones para impedir la formación de radicales libres a partir de peróxidos y Cu^{2+} , además es capaz de oxidar el ión Fe^{2+} a Fe^{3+} . El cobre no unido a la ceruloplasmina en el plasma está unido principalmente a la albúmina, pero parece ser que esta no previene su interacción con el H_2O_2 para formar el $\text{OH}\cdot$ (Gutteridge, 1986; Thurnham, 1990; Vethanayagam y cols, 1999).

2.1.3.2. Sistemas de defensa secundarios

2.1.3.2.1. Enzimas

- **Glutación peroxidasa no dependiente de selenio (GPx)**

Además de las SeGPx, ya descritas, la mayoría de las células tienen una actividad GPx, a cargo de otras enzimas cuya actividad principal parece estar relacionada con desintoxicación de xenobióticos y que se conocen con el nombre de GSht. Estas enzimas también son capaces de metabolizar hidroperóxidos lipídicos de bajo peso molecular. Para actuar sobre los hidroperóxidos, estos han de ser liberados previamente de los fosfolípidos de membrana (Van Kuijk y cols, 1987; Ketterer y Meyer, 1989).

- **Oxidoreductasas**

Todas las oxidoreductasas que participan en la reducción de grupos proteicos oxidados por ROS se consideran sistemas de defensa antioxidante (Davies y cols, 1990).

- **Proteasas**

El acúmulo de proteínas con daños irreversibles es perjudicial para las células. Por ello, la degradación de proteínas oxidadas tiene un efecto protector. La principal vía de degradación de proteínas intracelulares en células mamarias es la vía ubiquitin-proteasoma ATP-dependiente (Golberg y cols., 2006).

- **Sistemas enzimáticos de reparación del DNA**

Las enzimas implicadas en los procesos de reparación del DNA se consideran sistemas de defensa antioxidante. La DNA polimerasa I, la DNA ligasa, las endonucleasas o las glucosilasas, encontradas en distintos tipos de eucariotas, son algunos de ellos (Davies y cols, 1990). Cuando el daño al DNA es irreparable, actúa otra enzima diferente, la poli-(ADP-ribosa) sintetasa. Esta enzima, que se activa por la ruptura de las hebras del DNA, añade grupos de ADP-ribosa a aminoácidos o a otros grupos de ADP-ribosa previamente unidos a proteínas ligadas al DNA, e impide que el DNA se empaquete correctamente. Una activación excesiva de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa puede provocar el agotamiento de las reservas NAD, sustrato de esta enzima de esta enzima causando un descenso de los niveles de ATP y muerte celular (Cerutti, 1985; Pieper y cols, 1999).

2.1.3.2.2. Secuestradores no enzimáticos

- **Vitamina E**

Es la vitamina antioxidante liposoluble distribuida más ampliamente en la naturaleza. En realidad, se trata de un conjunto de compuestos estrechamente relacionados denominados tocoferoles, de los cuales, el más abundante es el α -tocoferol.

Los tocoferoles se encuentran principalmente en las membranas de la mayoría de las células, protegiéndolas de la lipoperoxidación. Normalmente funcionan reaccionando con radicales libres peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) donándoles un hidrógeno y transformándolos en hidroperóxidos lipídicos metabolizables por las GPx. De esta manera se interrumpe la reacción de propagación en cadena de la peroxidación lipídica. El radical α -tocoferoxilo que se origina se reduce por la pareja redox ascorbato-GSH, o bien reacciona con otro radical peroxilo para formar un aducto estable (Parer, 1991; Prior, 2000)

Casi todos los componentes de esta familia de polienos poseen actividad antioxidante. El β -caroteno se acumula en altas concentraciones en las membranas de distintos tejidos. Es capaz de reaccionar con el radical peroxilo para formar otro radical de resonancia estable, que a su vez puede reaccionar con otro radical peroxilo y dar un compuesto no radicalario. Esta reacción se da más fácilmente a concentraciones de O_2 bajas y complementa la acción de la vitamina E, que funciona más eficazmente a concentraciones de O_2 altas. Además de los radicales peroxilo, los carotenoides pueden atrapar también otros tipos de radicales libres y especialmente, el $^1\text{O}_2$ (Bendich y Olson, 1989; Di Mascio y cols, 1991).

- **Ubiquinol**

El ubiquinol o coenzima Q reducida (QH_2) es un antioxidante natural que interviene en la regeneración de la vitamina E y en

la eliminación de radicales peroxilo y alcoxilo. Su papel como antioxidante es discutido, puesto que tras su actuación se convierte en semiquinona (SQH), un radical libre con actividad prooxidante (Leibovitz y cols, 1990).

- **Bilirrubina**

Este producto del catabolismo de las hemoproteínas se ha propuesto como un antioxidante de gran importancia fisiológica. Posiblemente funciona racionando con los radicales peroxilo que se originan durante la lipoperoxidación (Stocker y cols, 1990).

2.1.4. ROS y progresión tumoral

Además del efecto mutagénico y su consiguiente implicación en la fase de iniciación del cáncer, los radicales libres están implicados en las fases de promoción de la proliferación y progresión cancerosa. Se ha observado como las ROS tienen capacidad de inducir tanto la proliferación (Burdon, 1995) como la muerte celular (Slater y cols, 1995b). Los mecanismos que rigen estos procesos no están bien establecidos y parecen dependientes del tipo celular y de la concentración intracelular de ROS. Se ha observado que, tanto el H_2O_2 como el $\text{O}_2^{\cdot-}$, son capaces de inducir la mitosis en diferentes tipos celulares de mamífero (Klaunig y Kamendulis, 2004). En estudios realizados sobre la influencia de las ROS en la proliferación celular, se

demostró como la inducción de la proliferación celular ocurre sólo a bajas concentraciones o exposiciones transitorias a las ROS (Fiorani y cols, 1995). Mientras que elevadas concentraciones de ROS inducen muerte celular por apoptosis (Klaunig y Kamendulis, 2004) o necrosis. Así pues, para explicar el papel de las ROS, es más lógico pensar en una modulación génica temporal dependiente del estado celular, del estímulo y de la capacidad de respuesta ante el estímulo oxidativo. Una breve exposición a estrés oxidativo activa vías específicas que inducirán supervivencia o muerte celular. En estudios con las células PC-12-D (2) R se observó que la activación de ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) induce transcripción de genes de supervivencia. En las que se activa TP53, se activa la caspasa 3, cuyo resultado es muerte celular por apoptosis. La decisión de sobrevivir o morir, tras la exposición al estrés oxidativo, es muy temprana (Nair y cols., 2004).

El Ca^{2+} está implicado en múltiples procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Klaunig y Kamendulis, 2004). El mecanismo por el cual las ROS estimulan la proliferación celular tumoral es, en parte, Ca^{2+} dependiente. La inducción de protooncogenes, como c-fos, por bajas dosis de ROS, está mediada directamente por la concentración de Ca^{2+} citosólico. Por otra parte, la fosforilación de factores de transcripción por proteínas quinasas Ca^{2+}

dependientes, es un ejemplo de modulación indirecta. La activación de estas quinasas, como la protein quinasa c (PKC) y S6-quinasa, puede regular la actividad de factores de transcripción vía cascadas de fosforilaciones múltiples, y pueden mediar muchos de los efectos de los radicales libres sobre la proliferación celular (Larsson y Cerutti, 1988; Larsson y Cerutti, 1989). Los radicales libres también pueden modular directamente la proliferación celular. Por ejemplo, las ROS pueden alterar la actividad de la PKC por oxidación de residuos Cys en el centro activo de la enzima (Gopalakrishna y Anderson, 1989).

Las ROS también inducen la transcripción de genes específicos, aunque los mecanismos por los que el balance oxidantes/antioxidantes es capaz de modularla no son bien conocidos. Se han descrito 2 fases en la activación de la transcripción por estrés oxidativo: la primera concierne al mecanismo de redistribución de los factores de transcripción en el núcleo. La segunda está relacionada con la unión a la región promotora del gen diana (Arrigo, 1999). Además, se ha observado que diversos factores de transcripción poseen cisteínas, muy sensibles al estrés oxidativo y esenciales para el reconocimiento del sitio de unión al DNA. La oxidación de estos residuos produce la inhibición de la unión del factor de transcripción. La presencia en el núcleo de tiorredoxina y/o Ref-1 son necesarias en muchas ocasiones, para crear un

ambiente reductor que evite la oxidación de estas cisteínas y favorezca la unión de los factores de transcripción al DNA (Holmgren, 1985; Xanthoudakis y Curran, 1992).

Entre los factores de transcripción mejor estudiados en la respuesta al estrés oxidativo se encuentran: AP-1 (proteína activadora 1) y NF- κ B (factor nuclear kappa-B).

AP-1 es un factor de transcripción que se une a regiones promotoras de una amplia variedad de genes relacionados con la proliferación y la promoción tumoral. Es activado por diferentes factores de crecimiento, activadores de la PKC y reguladores de la homeostasis redox intracelular (Arrigo, 1999). AP-1 es un dímero formado por proteínas c-Fos y c-Jun, productos de los protooncogenes c-fos y c-jun. La estimulación de dichos protooncogenes puede ser inducida por diferentes agentes que causan la acumulación intracelular de ROS como el TNF, la radiación UV o el H₂O₂ (Datta y cols, 1992; Lo y Cruz, 1995). La actividad transcripcional de AP-1 está regulada por el estado redox de una cisteína específica, lo cual acentúa la importancia del estado redox en su regulación (Klatt y cols, 1999).

El estrés induce una cascada de señales que comienzan con la activación de MAP quinasas (Chang y Karin, 2001). Las MAP quinasas, una familia de serina treonina quinasas, se encuentran involucradas en la regulación de diferentes procesos implicados en la carcinogénesis, tales como

proliferación, diferenciación y apoptosis. Se han identificado 3 subfamilias: ERK, JNK (quinasa N-terminal de c-Jun) y quinasa p38. Las MAP quinasas modulan la expresión génica mediante la fosforilación de diferentes factores de transcripción. La subfamilia ERK se asocia con la regulación de la proliferación celular. La activación de ERK, JNK y p38 se ha asociado a la respuesta ante cambios en el equilibrio redox (Klaunig y Kamendulis, 2004). Se ha observado como la inducción de AP-1 por H₂O₂ está mediada por JNK y p38 (Chang y Karin, 2001).

NF-κB es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes en células eucariotas y participa en la respuesta inmune y al estrés, a la inflamación y la apoptosis (Arrigo, 1999; Jang y Surh, 2003a). NF-κB es un heterodímero localizado en el citoplasma, donde se encuentra asociado a una familia de inhibidores citoplasmáticos (IκB). Aunque la localización de NF-κB y de IκB es predominantemente citoplasmática, existen evidencias que muestran también una localización mitocondrial (Cogswell y cols, 2003). Tras un estímulo de activación, el complejo NF-κB -IκB se disocia por fosforilación del inhibidor, facilitando la traslocación de NF-κB al núcleo. La posterior ubiquitinación y degradación de IκB por el proteasoma, también forma parte del proceso de activación del NF-κB (Arrigo, 1999).

La sobreexpresión de NF-κB suprime la inducción de apoptosis (Foo y Nolan, 1999). En células PC12 resistentes al estrés

oxidativo, inducido por el péptido β -amiloide y H_2O_2 , se potencia la actividad transcripcional y de unión al DNA del NF- κ B (Lezoualc'h y cols, 1998). La dexametasona y la sobreexpresión de I κ B- α impiden la actividad transcripcional de NF- κ B y revierten la resistencia al H_2O_2 (Lezoualc'h y cols, 1998). También se ha observado como la utilización del antioxidante ditiocarbamato pirrolidina impide la activación del NF- κ B por inhibición de la fosforilación y degradación de I κ B- α (Oka y cols, 2000; Schreck y cols, 1992). Al igual ocurre con la N-acetil cisteína, tras la estimulación con TNF, la cual además suprime la traslocación de NF- κ B al núcleo (Oka y cols, 2000). NF- κ B también está involucrado en la expresión de genes antiapoptóticos y en la promoción de la supervivencia celular; de hecho la regulación transcripcional de enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GPx está mediado parcialmente por NF- κ B (Jang y Surh, 2003a).

2.2. Óxido nítrico y especies reactivas del nitrógeno.

Generalidades

El descubrimiento del óxido nítrico (NO) y de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) ha añadido una nueva dimensión a la patología y fisiopatología relacionada con el estatus redox celular.

El NO, molécula gaseosa no cargada, es un radical libre ya que posee un electrón desapareado. Producida por todas las células es capaz de inducir múltiples efectos biológicos. En el sistema nervioso central, regula la liberación de neurotransmisores. En los procesos inflamatorios participa en la citotoxicidad mediada por macrófagos y neutrófilos (Rodrigo y cols, 2000). Por otra parte, el NO liberado por el endotelio vascular produce la vasodilatación por activación de la guanilato ciclasa en el músculo liso vascular (Moncada, 1997; Moncada y Higgs, 1993). Es por ello que, en un principio, el NO recibió el nombre de factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). El NO está implicado en muchos procesos fisiopatológicos como son el shock séptico, la hipertensión, la deficiencia inmunitaria, la impotencia, la isquemia cerebral, algunos desórdenes neurodegenerativos, la diabetes y el cáncer (Brennan y cols, 1999).

Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza lipofílica, el NO difunde rápidamente a través de las membranas plasmáticas. Su semivida biológica es relativamente larga, oscila entre 0.1 y 5 segundos (Gaston y cols, 1994), siendo sus efectos regulados fundamentalmente por la tasa de síntesis.

2.2.1. Formación de NO y RNS

El NO se sintetiza a partir de L-arginina en un complejo proceso catalizado por una familia de óxido reductasas, las óxido nítrico sintasas (NOS). Para que se lleve a cabo la reacción se utilizan como sustratos: L-arginina, NADPH y O₂; y como cofactores: FAD y FMN. Su actividad enzimática puede ser incrementada por otro cofactor, la tetrahidrobiopterina (Knowles y Moncada, 1994).

Existen tres isoformas de NOS caracterizadas por su distribución tisular, dependencia de Ca⁺² y expresión génica constitutiva o inducible. La NOS tipo I (nNOS) es una enzima constitutiva presente en las neuronas y dependiente de Ca⁺². La NOS tipo II (iNOS) es una enzima inducible que se expresa en muchos tipos celulares, como el endotelio vascular, los hepatocitos, los miocitos cardíacos o el epitelio respiratorio, y su actividad es independiente del Ca⁺² intracelular. La expresión de esta enzima es inducida por algunas citoquinas y mediadores de la inflamación como diferentes interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-6), el TNF- α o el IFN- γ , a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B. La NOS tipo III (eNOS) se sintetiza constitutivamente en el endotelio vascular y su actividad también depende del Ca⁺² intracelular (Hobbs y cols, 1999; Mayer y Hemmens, 1997; Michel y Feron, 1997).

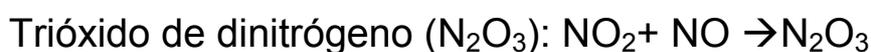
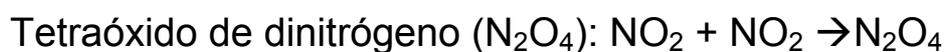
Algunos autores han descrito una NOS funcional en las mitocondrias de hígado de rata (Ghafourifar y Richter, 1997;

Giulivi y cols, 1998; Tatoyan y Giulivi, 1998). Estudios posteriores revelaron que la enzima se localiza principalmente en la membrana mitocondrial interna, próxima a los complejos de la cadena respiratoria. La producción de NO medida en mitocondrias permeabilizadas, es dependiente de L-arginina y NADPH, y puede ser parcialmente bloqueada por inhibidores de las NOS. Lo que sugiere una isoforma estructuralmente similar a las NOS ya descritas. No obstante, la NOS mitocondrial, muestra una expresión constitutiva, como las NOS endotelial (III) y neuronal (I) y, a la vez, independiente de Ca^{+2} como la inducible (II), por lo cual se ha postulado como una nueva isoforma. La producción de NO por la mitocondria podría estar relacionada con la modulación de la respiración mitocondrial, la regulación de la disponibilidad de O_2 y energía de los tejidos y quizás, con la señalización intramitocondrial que activa la apoptosis.

El NO tiene capacidad para reaccionar con otros radicales libres, con oxígeno molecular y con metales pesados. Debido a que el NO es una molécula menos reactiva que otros radicales libres como el $\text{O}_2^- \cdot$ (Brennan y cols, 1999), se ha sugerido que sus efectos biológicos están mediados por diferentes metabolitos. Por ejemplo, el NO puede reaccionar rápidamente en el medio intracelular y formar nitrito y nitrato, S-nitrosotioles o peroxinitrito, los cuales, como se verá posteriormente, están implicados en los efectos genotóxicos asociados a la

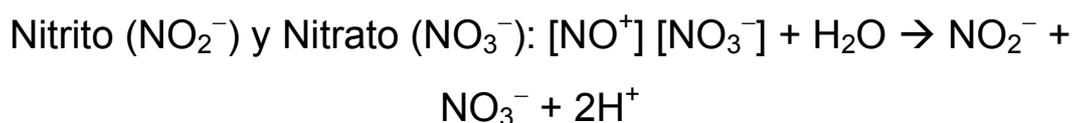
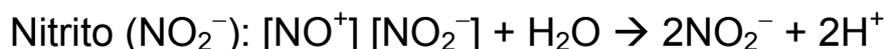
generación del NO (Xu y cols, 2002). Las reacciones más características en la formación de RNS son (Rodrigo y cols, 2000) (figura10):

Figura 10: Formación de RNS



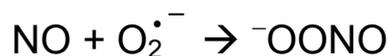
Tanto el N_2O_4 como el N_2O_3 , igual que el ácido nitroso (HNO_2), son especies muy reactivas que en fase acuosa son donadores de iones nitrosonio (NO^+), los cuales pueden transferirse a diferentes nucleófilos produciendo nitrosaminas y nitrosotioles (figura 11).

Figura 11: Producción de nitrosamina y nitrosotioles



El NO al reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ genera peroxinitrito (${}^-\text{OONO}$) (Hibbs y cols., 1988). Como se ha indicado anteriormente la SOD es el mecanismo de eliminación de $O_2^{\cdot-}$. La reacción entre el NO y el $O_2^{\cdot-}$ establece una competencia entre el NO y la SOD por el $O_2^{\cdot-}$, de forma que se puede favorecer la formación de ${}^-\text{OONO}$ en lugar de H_2O_2 (figura 12):

Figura 12: Reacción de producción de ${}^-\text{OONO}$



En condiciones fisiológicas el conjugado ácido del peroxinitrito, el ácido peroxinitroso (HOONO), es tan reactivo como los radicales $\text{OH}\cdot$ (Pryor y Squadrito, 1995).

El NO también puede actuar en los sistemas biológicos a través de su reacción con metales de transición, por esta razón reacciona con diferentes proteínas como la hemoglobina, citocromo c oxidasa, mioglobina, etc. (Rodrigo y cols, 2000; Xu y cols, 2002). Cuantitativamente, la reacción más importante del NO en los mamíferos es la reacción con la oxihemoglobina. Esta reacción es una transferencia de O_2 mas un electrón al NO, formando anión nitrato y metahemoglobina (Rodrigo y cols, 2000).

2.2.2. Mecanismos de acción del NO y de las RNS

El estudio de la química del NO ha cobrado una gran importancia en los últimos años dada la implicación del NO y de sus derivados en muchos procesos fisiológicos. En un principio, podríamos clasificar las reacciones químicas en las que participan en dos tipos, directas e indirectas (Wink y cols, 1996; Wink y cols, 1998). En las primeras, el NO a bajas concentraciones reacciona rápida y directamente con una determinada diana molecular. Este es el caso de la interacción del NO con hemoproteínas como la guanilato ciclasa (mecanismo de dilatación vascular), el citocromo P450 o la hemoglobina. En las reacciones indirectas participan RNS como el $\cdot\text{OONO}$. Estas reacciones requieren altas concentraciones localizadas de NO, sintetizado en la mayoría de los casos por la iNOS. A su vez, las reacciones indirectas podríamos dividir las en dos tipos, las de nitrosación y las de oxidación (Wink y cols, 1998). En las reacciones de nitrosación las RNS reaccionan con nucleófilos como los tioles y las aminas para formar S-nitrosotioles y nitrosaminas, generando “estrés nitrosativo”, un término acuñado conceptualmente a semejanza del estrés oxidativo. En las reacciones de oxidación, las RNS actuarían de un modo análogo a las ROS mediando oxidaciones e hidroxilaciones sobre biomoléculas (lipoperoxidación, hidroxilación de proteínas, roturas de la cadena de DNA, etc.).

La sobreexpresión de NOS en la inflamación crónica o durante la respuesta antitumoral puede ser genotóxica. Este hecho establece un vínculo directo entre inflamación crónica y carcinogénesis. Células que sobreexpresan iNOS pueden sufrir desaminaciones y otras lesiones en el DNA (Gal y Wogan, 1996).

El NO generado *in vivo* tiene el potencial de causar mutaciones mediante tres posibles mecanismos: a) formación de nitrosaminas carcinogénicas, b) modificación directa del DNA por RNS, c) inhibición de los sistemas responsables de la reparación del DNA dañado por otras sustancias genotóxicas. Además, algunas RNS pueden producir roturas de la cadena de DNA.

Las nitrosaminas se pueden formar por reacciones químicas asociadas al estrés nitrosativo y son potencialmente carcinogénicas. De hecho, el NO en ambientes aeróbicos puede acabar formando nitrosaminas, además de N_2O_3 y $^-\text{OONO}$, capaces de alterar al DNA y producir una gran variedad de daños moleculares (Wink y cols, 1996). Las reacciones de nitrosación son relevantes *in vivo* cuando se estimulan macrófagos y neutrófilos, ya que expresan iNOS y sintetizan grandes cantidades de NO capaces de reaccionar con las aminas (Marletta, 1988; Miles y cols, 1995). Las células bacterianas y de mamífero, expuestas al NO, sufren lesiones en el DNA debidas a reacciones de desaminación. Estas

reacciones ocurren *in vivo* sobre las bases nitrogenadas de los nucleótidos, preferentemente de cadena simple, y están mediadas por reacciones químicas en las que interviene el N_2O_3 (Nguyen y cols, 1992; Wink y cols, 1991). El daño sobre el DNA es producido fundamentalmente por el $^-\text{OONO}$, el cual, induce roturas en la cadena de DNA, transversiones GC a TA, GC a CG y transiciones GC a AT.

Estas observaciones indican que las nitrosaminas pueden producirse en condiciones de inflamación crónica y participar en la carcinogénesis (Liu y Hotchkiss, 1995; Ohshima y Bartsch, 1994).

La aparición de roturas, oxidaciones y desaminaciones en los ácidos nucleicos requiere altas concentraciones de RNS o NO. En el microambiente celular estas especies interactúan con sistemas antioxidantes que evitan su acumulación. De acuerdo con este razonamiento se ha observado que los agentes donantes de NO son incapaces de inducir mutaciones en el gen de la proteína TP53 (Felley-Bosco y cols, 1995), lo que sugiere que ni el NO ni los RNS pueden considerarse mutágenos potentes *per sé*, y que la genotoxicidad de estos compuestos puede deberse a otros mecanismos. Por ejemplo, el NO afecta a las actividades enzimáticas de proteínas de la reparación del DNA, lo cual podría aumentar la tasa de mutaciones de forma indirecta (Laval y Wink, 1994). Estos enzimas contienen grupos tioles en sus sitios activos

susceptibles de sufrir nitrosilaciones que causen la pérdida de la actividad catalítica (Wink y Mitchell, 2003).

El NO y sus derivados también pueden afectar a la expresión y actividad de proteínas oncogénicas del ciclo celular y del proceso apoptótico. Se ha observado como el NO puede interferir en la actividad del proteasoma, lo cual se ha relacionado con un aumento en la expresión de p53 y la inducción de muerte celular por apoptosis (Glockzin y cols, 1999).

2.2.3. Efectos tumorigénicos y tumoricidas del NO

La producción de NO por la eNOS y la nNOS es regulada por la fluctuación de los niveles intracelulares de Ca^{+2} . El NO es producido durante breves periodos de tiempo y mediará diferentes funciones fisiológicas como la transmisión neuronal. La iNOS la expresan, por ejemplo, macrófagos en respuesta a citoquinas como el IFN- α , IFN - β , IFN - γ , IL-1 α , IL -1 β , TNF- α y lipopolisacáridos bacterianos. La expresión de iNOS es regulada fundamentalmente a nivel transcripcional (Nathan, 1992). Una vez estimulada produce una gran cantidad de NO durante un largo periodo de tiempo, incluso días. Esto es muy efectivo en procesos de inflamación, infección o en la defensa del organismo contra células tumorales (Xie y Huang, 2003).

En la biología tumoral el NO presenta 2 efectos paradójicos que todavía no son plenamente comprendidos. El NO puede estimular la proliferación tumoral (efecto tumorigénico) e inducir la muerte celular (efecto tumoricida). Para poder entender el papel del NO en la proliferación tumoral y metástasis se han aplicado diferentes protocolos experimentales como, por ejemplo, la transfección de células tumorales con NOS y la utilización de inhibidores de las NOS. La presencia de NO es capaz de disminuir la agresividad del tumor (Wang y cols, 2001; Xie y Fidler, 1998). Por el contrario, se ha observado como el NO es capaz de aumentarla (Jenkins y cols, 1994). Los dos principales determinantes para el efecto del NO parecen ser el tipo celular estudiado y la cantidad de NO producido. Cantidades muy elevadas de NO limitan la angiogénesis, con lo que la masa celular tumoral puede verse disminuida por apoptosis, mientras que una cantidad baja de NO aumenta la vascularización y protege a las células de la apoptosis (Wink y Mitchell, 2003). También se ha observado como células de carcinoma de colon humano aisladas de tumores secundarios, sintetizan menos NO que células aisladas del tumor primario (Radomski y cols, 1991); lo cual sugiere que la producción de NO por parte de células metastáticas y no metastáticas puede ser importante para la supervivencia celular tumoral. Utilizando clones de las células de melanoma murino K-1735 con diferente capacidad metastática se estudió la expresión de iNOS en presencia de

diferentes citoquinas. Con esta pauta se evidenció una correlación inversa entre la capacidad de supervivencia y formación de metástasis y los niveles endógenos de NO producidos por la iNOS. Estos resultados sugieren que la disminución en la expresión de iNOS en células metastáticas las hace más resistentes a la inducción de apoptosis por citoquinas, lo cual aporta un beneficio evidente para la supervivencia celular tumoral tanto en la circulación como en el órgano invadido (Dong y cols, 1994).

3. POLIFENOLES NATURALES

3.1. Polifenoles naturales y salud

Los polifenoles (PFs) son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura química dos o más grupos fenólicos.

Surgen del metabolismo de las plantas, principalmente a partir de dos vías: la ruta del ácido shikímico y la del ácido acético (Harborne, 1989).

Son imprescindibles para la fisiología de la planta, pues contribuyen a la resistencia frente a microorganismos e insectos, y ayudan a preservar la integridad amenazada por su

continua exposición a factores ambientales de estrés (p.e. radiaciones ultravioletas y altas temperaturas).

Se hallan en la práctica totalidad de los alimentos procedentes de las plantas, en verduras, legumbres, frutas, frutos secos y bebidas como el té, vino, cerveza, cacao, café, etc. Los niveles de éstos compuestos pueden variar considerablemente dentro de la misma especie, e incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos (Bravo, 1998; Scalbert y Williamson, 2000).

Antiguamente, algunos se consideraban antinutrientes porque tenían la peculiaridad de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, reduciendo la digestibilidad de algunos alimentos.

Sin embargo, en la década de los 90 aumentó el interés por los PF debido a sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Se propusieron efectos favorables en enfermedades cardiovasculares (Renaud, de Lorgeril y cols, 1992) o neurodegenerativas (Sun y cols, 2002), en la prevención y tratamiento del cáncer (Lambert y cols, 2005) y, en general, en todas aquellas enfermedades donde el estrés oxidativo tuviera un papel importante.

Estos efectos beneficiosos se explicaban fundamentalmente por las propiedades antioxidantes (Frankel y cols, 1995),

antiinflamatorias (Haqqi y cols, 1999) y anticancerígenas (Yang y cols, 2001) que presentaban los PFs.

3.2. Clasificación y estructura química de polifenoles

Los PFs constituyen uno de los grupos más abundantes dentro de los componentes presentes en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas actualmente (Harborne, 1989).

Los PFs naturales son muy diversos, hay desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, hasta compuestos muy polimerizados como los taninos.

Los PFs normalmente forman conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos al oxígeno de los grupos hidroxilo; aunque es posible también, encontrar unidos a átomos de carbono del anillo aromático. Los azúcares asociados pueden ser monosacáridos, disacáridos o polisacáridos. El residuo de glucosa es el más común, aunque también existen residuos de galactosa, rhamnosa, xilosa y arabinosa, así como ácidos glucurónico y galacturónico y algunos otros. Las asociaciones con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas y lípidos, incluso con otros fenoles, pueden resultar comunes.

De acuerdo con Harborne (1989), los polifenoles se pueden dividir en 10 tipos diferentes dependiendo de su esqueleto carbonado:

- **Fenoles simples (C_6)**
- **Ácidos fenólicos (C_6-C_1)**
- **Ácidos fenilacéticos (C_6-C_2)**
- **Fenilpropanoides (C_6-C_3)**, destacando los ácidos hidroxicinámicos que son muy abundantes, pues son los constituyentes básicos de las:
 - **Ligninas ($(C_6-C_3)_2$)** y
 - **Lignanos ($(C_6-C_3)_n$)**.
- **Naftoquinonas (C_6-C_4)**
- **Xantonas ($C_6-C_1-C_6$)**, los
- **Estilbenos y antraquinonas ($C_6-C_2-C_6$)** y
- **Flavonoides ($C_6-C_3-C_6$)**, que en forma de glicósidos son los más comunes y de mayor distribución en el reino vegetal. Los tres carbonos centrales, que únen dos anillos bencénicos, forman un anillo central de pirano, que se cierra en uno de los anillos bencénicos de la estructura.

Entre los **fenoles simples**, son abundantes el propio fenol, cresol, timol, etc., y derivados de la hidroxiquinona.

De entre los **ácidos fenólicos** destaca el ácido gálico, vainílico o siríngico, y sus aldehidos, como vainillina o siringaldehído.

También son frecuentes los derivados **fenilpropanoides**, destacando los ácidos hidroxicinámicos (ej. p-cumárico, cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico). Son muy abundantes, pues son los constituyentes básicos de las ligninas.

El grupo de los **flavonoides**, constituye el grupo de moléculas sencillas más numeroso de entre los 10 tipos diferentes. Hay más de 5000 tipos de flavonoides descritos. Los flavonoides están a su vez divididos en 6 subclases dependiendo del estado de oxidación del anillo central: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles.

Los más comunes de este grupo y de mayor distribución en el reino vegetal son las flavonas (ej. apigenina, luteoina) los flavonoles (ej. quercetina, miricetina, kaempferol) y sus glicósidos son.

Los flavonoles aparecen como O-glicósidos, mientras que las flavonas además se presentan también como C-glicósidos. Esta diferencia tiene su importancia porque los C-glicósidos, al contrario que los O-glicósidos, resisten a la hidrólisis ácida del azúcar ligado. Estos flavonoides presentan una gran

variabilidad y, prueba de ello, es que sólo de los flavonoles se han descrito más de 380 glicósidos diferentes. Los cuales glicósidos de quercetina y kaempferol suman 200.

Las flavanonas (ej. hesperidina, naringenina) se presenta como O- y C- glicósidos y abundan en cítricos y frutos en drupa como la familia de las prunáceas.

Los flavanoles (ej. catequina, epicatequina o galocatequina), por otro lado, se encuentran como monómeros libres o bien formando parte de los taninos condensados.

Las antocianidinas (ej. pelargonidina, malvidina o cianidina), destacan porque sus glicósidos, los antocianos o antocianinas, forman el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles de las plantas superiores, siendo responsables del color de las flores y de los frutos. Las antocianidinas, además de glicósidos, presentan comúnmente enlaces con ácidos aromáticos y alifáticos o derivados metil éster.

Otro grupo importante de polifenoles son los taninos que, a diferencia de los anteriores, poseen pesos moleculares elevados. Los taninos son moléculas muy hidroxiladas y pueden formar complejos insolubles con proteínas y polisacáridos. Su acción es responsable de la astringencia de los alimentos ricos en taninos, al provocar la precipitación de las proteínas de la saliva.

Los taninos se pueden dividir en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Ambos grupos pueden ser insolubles cuando aparecen en formas de elevado peso molecular.

Los taninos hidrolizables, como el ácido tánico, son polímeros que pueden alcanzar gran peso molecular, y se forman a partir de la condensación oxidativa de algunos fenoles, tales como el ácido gálico o ácido hexahidroxidifénico, previamente esterificados con polioles como la glucosa. El ácido tánico es una molécula de pentagalaoil glucosa. Este grupo de taninos, como su nombre indica, es fácilmente hidrolizable con ácido, álcali o por acción enzimática, liberando ácido fenilcarboxílico y alcoholes polihídricos.

Los taninos condensados están formados por monómeros de flavan-3-ol (catequina, epicatequina, etc.) por la condensación oxidativa producida a partir de precursores como flavan-3,4-diol o leucoantocianidinas. El grado de polimerización en las plantas varía, pues se han encontrado desde dímeros o trímeros hasta polímeros que superan las 50 unidades.

3.3. Polifenoles y efecto anticanceroso

Una ingesta elevada de frutas y hortalizas, ricas en PFs, parece asociarse a una disminución de la incidencia de los cánceres humanos más frecuentes: pulmón, colón, próstata y

mama (Neuhouser, 2004). Además de los datos epidemiológicos, existen numerosos estudios de laboratorio, fundamentalmente *in vitro*, donde se demuestran efectos anticancerígenos potenciales de los PFs naturales.

El interés por el estudio de los PFs como compuestos anticancerosos, no radica únicamente en el hecho que sean potentes antioxidantes, si no también, porque se ha comprobado que actúan a distintos niveles de la oncogénesis y progresión tumoral.

En muchos estudios de laboratorio se ha demostrado el efecto preventivo que pueden tener los PFs de la dieta sobre el cáncer. Un ejemplo lo tenemos en el té y sus derivados, que han demostrado efectos anticarcinogénicos, en distintos órganos como la piel, los pulmones, la cavidad oral, el esófago, el estómago, el hígado, el páncreas, el intestino delgado, el colon y la próstata (Katiyar y cols, 2001; Weisburger 1999; Yang y cols, 2002). Esta actividad anticarcinogénica es común a otros PFs, como la curcumina, genisteína y quercetina.

En los estudios *in vitro*, se comprobó que los PFs afectaban a las rutas de transducción de señales, causando la inhibición de su crecimiento celular tumoral y la apoptosis, reduciendo el comportamiento invasivo y disminuyendo la angiogénesis (Dulak J., 2005; Kandaswami C., 2005)

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las concentraciones utilizadas en los cultivos celulares son mucho mayores que las encontradas *in vivo*. La biodisponibilidad (concentración alcanzada en células y tejidos) de los polifenoles de la dieta es un factor determinante. Tenemos como ejemplo las curcuminas, efectivas al aplicarse vía tópica en la piel o vía oral actuando directamente sobre el epitelio intestinal pero no resultan efectivos en órganos internos como p.e. los pulmones. Diferentes estudios sobre biodisponibilidad, evidencian la escasa correlación entre los mecanismos determinados *in vitro* y las condiciones *in vivo*.

Los PFs del té son potentes antioxidantes *in vitro*, pero esta capacidad sólo se relaciona parcialmente con su efecto anticanceroso en algunos casos (Xu y cols, 1992; Frei y Higdon 2003). Algunos estudios sugieren que el efecto de muerte celular inducida por los PFs es debido a que son prooxidantes, por ejemplo, la EGCG (Epigallocatequina-3-galato) induce la apoptosis, no la inhibición del crecimiento tumoral (Azam y cols., 2004). De hecho, cuando se añadió EGCG a los cultivos celulares (ej. células HT29 en Medio McCoy 5A), se observó la producción de H₂O₂ (Hong y cols, 2002).

Algunos PFs son considerados como agentes químicos que previenen el cáncer debido a que inhiben la activación de carcinógenos, un proceso normalmente catalizado por el sistema citocromo P450.

Otros PFs son considerados agentes quimioeventivos porque induce las enzimas de Fase II. En teoría, la inducción de la Fase II facilita la eliminación de ciertos agentes carcinógenos o de intermediarios reactivos (Galli, 2007). Aunque por esta razón podrían ser considerados perjudiciales si indujeran el metabolismo de los fármacos que componen el tratamiento de un enfermo (Lambert y cols., 2007)

Algunos inhiben el metabolismo del ácido araquidónico, el cual permite la síntesis de agentes pro-inflamatorios y mitógenos como las prostaglandinas y las ROS. La inhibición de sustancias como la fosfolipasa A₂, la COX o la lipooxigenasa es potencialmente beneficiosa y ha sido propuesto como posible mecanismo anticancerígeno de la curcumina y otros polifenoles.

PFs como las isoflavonas (daidzeina y genisteina) y lignanos son fitoestrógenos, y se ha demostrado que regulan la carcinogénesis hormono- dependiente en animales, e incluso con la no hormono-dependiente como p.e. en ratones portadores de cáncer de próstata, pecho o piel.

La modulación de diversos oncogenes, de genes supresores de tumores y de las señales de transducción puede conducir a inhibir la proliferación, la transformación y la angiogénesis celular, así como a activar el mecanismo de apoptosis.

El resveratrol (RESV), un estilbeno, ha despertado un gran interés en la comunidad científica debido al amplio espectro de sus efectos biológicos. Sus propiedades anticancerosas fueron propuestas por primera vez por Jang y cols. (Jang y cols, 1997). Los mecanismos anticancerígenos propuestos para el RESV incluyen:

a) Inhibición de las actividades ribonucleótido reductasa (Fontecave y cols, 1998), DNA polimerasa (Sun y cols, 1998), proteín kinasa C (Stewart y cols, 1999) o ciclooxigenasa-2 (Martin y cols, 2004)

b) Inhibición de la proliferación celular (Sauer y cols, 2001) y de la carcinogénesis inducida por radicales libres (Jang y cols, 1997); y

c) La inducción de la apoptosis (Martin y cols, 2004) (Tinhofer y cols, 2001).

3.4. Biodisponibilidad de los polifenoles

La biodisponibilidad es un término farmacéutico que alude a la porción de la dosis, de un fármaco o nutriente administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción. Este concepto puede utilizarse para cuantificar el grado en que una sustancia es aprovechada por el organismo.

Para poder afirmar que los PFs ejercen un efecto beneficioso sobre la salud no es sólo necesario conocer la ingesta diaria de éstos, también es fundamental conocer su biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de los PFs depende de su estructura química y, además, de las reacciones metabólicas que experimentan tras su ingestión. En algunos estudios se demuestra que dependiendo del PF que se trate, éste tendrá un índice de absorción y de eliminación diferente, resultando ser por ejemplo, el ácido galico e isoflavonas los PFs que tienen mayor índice de absorción seguidos de la catequina, las flavanonas y de la quercetina glucosilada (Manach y cols., 2004) .

La estructura química influye tanto en la absorción intestinal, en las reacciones de conjugación (metilación, sulfatación y glucuronidación) que pueden sufrir, así como en la naturaleza y cantidad de metabolitos formados por la flora intestinal, por ejemplo existen metabolitos como el equol, enterolactona y enterodiol que tienen efectos sobre receptores estrogénicos (D'Archivio y cols., 2007).

La absorción intestinal está relacionada con el grado de glicosilación, acilación y esterificación de los compuestos fenólicos. Algunos PFs no se pueden absorber en su forma natural. Antes de su absorción deben sufrir diversas transformaciones o bien por efecto de algunas enzimas intestinales o por efecto de la microflora colónica.

Los PFs se presentan glicosilados, acetilados o en forma de ésteres.

La glicosilación es un proceso químico en el cual, se adiciona un carbohidrato a otra molécula. Cuando se da sobre un grupo alcohol o tiol, se denomina glicosidación y la molécula resultante es el glicósido.

La mayoría de los PFs en los alimentos están presentes en su forma glicosilada. Probablemente, la mayoría de ellos aguantan la hidrólisis ácida del estómago y llegan enteros al intestino delgado, donde sólo las formas aglicosiladas se pueden absorber. En estudios experimentales *in vivo*, se ha demostrado que algunos flavonoides como la quercetina, se pueden absorber a nivel gástrico pero no en sus formas glicosiladas, lo mismo se demostró con algunos antocianos. La glicosilación, tiene sus beneficios, en el caso del resveratrol hace que esté sea más estable y soluble además de resultar protegido de su degradación oxidativa (D'Archivio y cols., 2007).

El PF glicosilado se vuelve hidrofílico y la eliminación de sus residuos de azúcar es necesaria para su difusión pasiva a través de la luz intestinal. Aquí tienen un papel importante las β -glicosidasas endógenas humanas, como la β -glicosidasa citosólica, están presentes en muchos tejidos, sobre todo en hígado e intestino delgado, y rompen residuos como glucosa, arabinosa, xilosa, etc. Además, la presencia de una β -

glicosidasa, lactasa florizina hidrolasa (LPH), en el exterior de la membrana de las células en cepillo del intestino delgado, confirma este extremo (Day y cols, 2000). Las β -glicosidasas sin embargo, no son capaces de atacar ramnosa, caso del flavonol rutina (quercetina-3-O-ramnoglucósido), el cual, sólo es liberado por las α -ramnosidasas de la microflora intestinal.

La acilación es de menor trascendencia para la biodisponibilidad. Los flavanoles, como la epicatequina, suelen estar acilados, sobre todo por ácido gálico.

La esterificación es común en ácidos fenólicos. El ácido clorogénico, por ejemplo, es un ácido cafeico unido por enlace éster a ácido quínico, y está a alta concentración en el café y en las ciruelas. En humanos no existen esterasas, con lo que los polifenoles esterificados sólo pueden ser metabolizados por la flora colónica (Spenser y cols, 1999).

Una vez absorbidos los PFs sufren conjugaciones, incluyendo metilaciones, sulfataciones, glucuronidaciones o combinaciones de ellas, que forman parte del proceso de detoxificación que sufren los xenobióticos para facilitar su eliminación biliar y urinaria.

El control de estas reacciones es asumido por enzimas endógenas específicas de cada reacción, como las UDP-glucuronosil transferasas (UDPGT), catecol-O-metil

transferasas (COMT), sulfotransferasas y varias enzimas hepáticas de las fases I y II (Rechner y cols, 2002).

La catecol-O-metil transferasa cataliza la transferencia de un grupo metilo desde la *S*-adenosil-*L*-metionina a PFs como la quercetina, luteolina, ácido cafeico, catequinas y cinidinas. La actividad de esta enzima se presenta en el riñón e hígado principalmente.

La sulfoniltransferasa cataliza la transferencia de un grupo sulfato desde la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato a los grupos hidroxilos de diversos sustratos incluidos los PFs. Normalmente se presenta en el hígado pero hay que decir que la sulfatación de los PFs aún no está del todo definida.

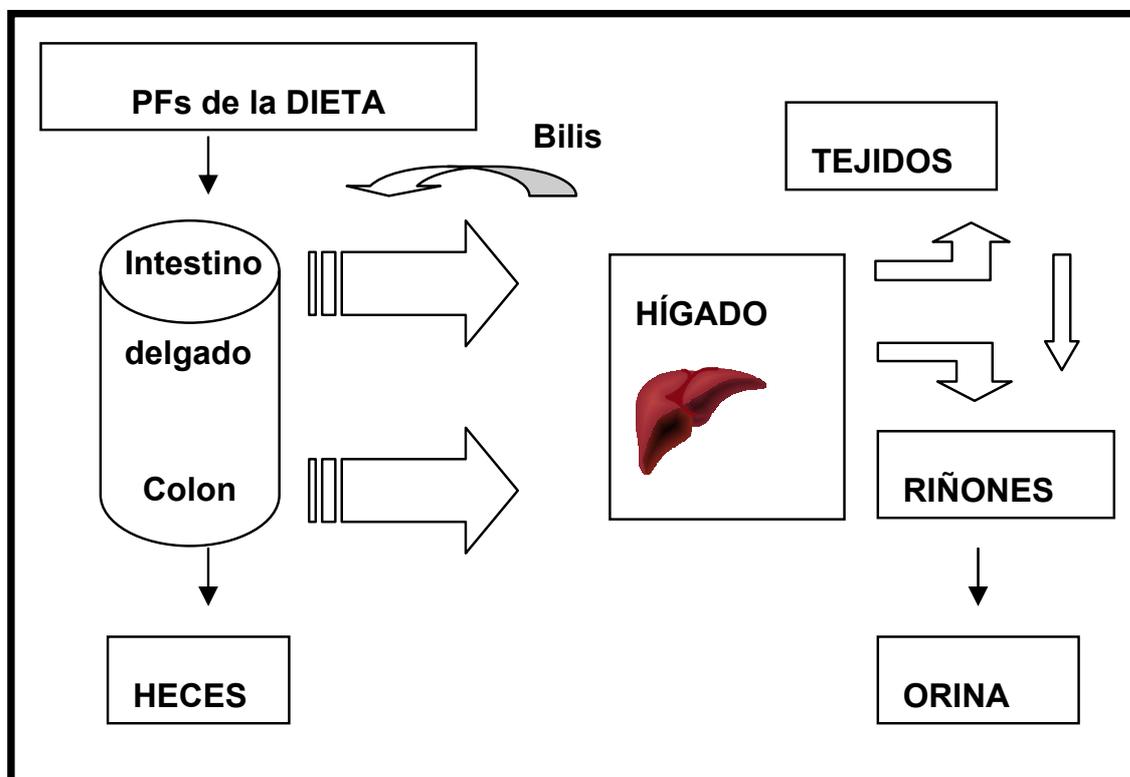
La UDP-glucuronosiltransferasa son enzimas de membrana situadas en el retículo endoplasmático de numerosos tejidos. Cataliza la transferencia del ácido UDP-glucurónico tanto a PFs como esteroides, ácidos biliares y principales constituyentes de la dieta. La glucuronidación se produce en el intestino e hígado.

Parece ser que los PFs son primero glucuronizados, durante la absorción intestinal, y después sulfatados y metilados en hígado; y posiblemente de nuevo metilados en riñones antes de su excreción, tanto en ratas (Piskula y Terao, 1998; Spenser y cols, 1999) como en humanos (Erlund y cols, 1999; Watson y Oliveira, 1999).

Los PFs no absorbidos llegan al colon donde son metabolizados por la flora bacteriana. Además, los que son absorbidos y metabolizados en el hígado pueden regresar al intestino vía circulación enterohepática y alcanzar, así, el colon en una forma química diferente.

El colon posee un enorme potencial catalítico e hidrolítico. Las reacciones de desconjugación tienen lugar rápidamente, liberando los aglucones de los flavonoides. Algunas bacterias son capaces también de hidrolizar los aglucones hasta compuestos fenólicos más sencillos, como ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos, que pueden ser absorbidos, como lo denota el hecho de que son encontrados en orina después del consumo de flavonoides. Este tipo de metabolitos son ácidos aromáticos que aún poseen grupos fenólicos libres y pueden, por tanto, retener parte de la capacidad reductora de la molécula madre. Esto contribuiría a explicar el aumento en la capacidad antioxidante de plasma observada tras el consumo de productos ricos en flavonoides, como el vino tinto, té o algunos zumos de frutas. Se debe también tener en cuenta que las concentraciones de estos metabolitos (y también de flavonoides) serán mucho mayores en el intestino que en plasma, por lo que es presumible que ejerzan efectos locales (Scalbert y Williamson, 2000).

Figura 13: Distribución biológica de los PF ingeridos



La biodisponibilidad de los PFs, tras su administración oral, es normalmente muy baja. Es muy raro que superen en tejidos una concentración $\geq 10 \mu\text{M}$. Por tanto, todos aquellos efectos descritos *in vitro*, a concentraciones superiores a su biodisponibilidad, no se deben extrapolar a modelos *in vivo*. El RESV es un caso paradigmático (Asensi y cols, 2002).

3.4.1. Resveratrol y biodisponibilidad

El potencial anticancerígeno del RESV está limitado por su baja biodisponibilidad (Asensi y cols, 2002).

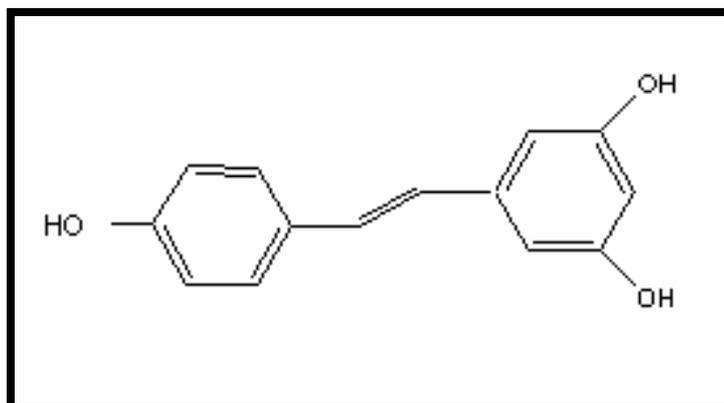
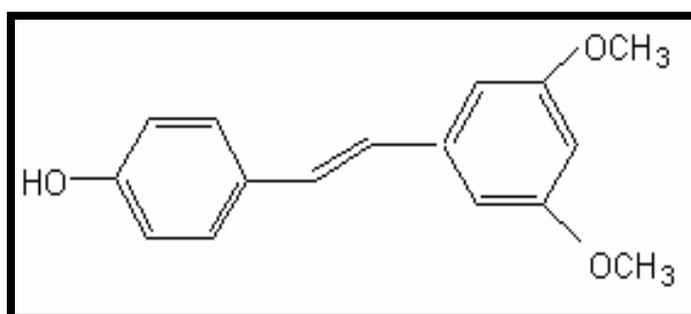
Modificaciones estructurales de la molécula del RESV preservando la actividad biológica, representarían una estrategia muy útil.

Existe una relación entre la estructura química y la actividad del RESV:

El grupo OH en posición 4' y la configuración *trans* son determinantes estructurales necesarios para inhibir la proliferación celular (Stivala y cols, 2001).

El *t*-PTER es un análogo estructural dimetoxilado del RESV, con propiedades anticancerígenas similares (Rimando y cols., 2002) y que mantiene esos determinantes estructurales (figura 14).

En estudios previos ha demostrado ser un potente antifúngico (60-100 veces más potente que el RESV).

Figura 14: Estructura química del RESV y del t-PTER**Resveratrol****t- Pterostilbeno**

Además, la QUER que presenta propiedades anticancerígenas (estimulación inmunológica, captura de radicales libres, alteración de la mitosis, inhibición de la expresión génica, disminución de la angiogénesis, inducción la apoptosis o una combinación de estos efectos (Lamson y cols., 2000; Ross y cols., 2002) y podría competir con el PTER por el metabolismo hepático aumentando aún más su biodisponibilidad. De hecho, la QUER compite con el RESV en el metabolismo hepático (De Santi y cols, 2000)

OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis es estudiar los efectos anticancerosos de la asociación de t-PTER y QUER a concentraciones biodisponibles, sobre células de melanoma maligno B16M.

Para alcanzar este objetivo general nos planteamos los siguientes **objetivos concretos**:

1. Determinar las concentraciones biodisponibles de PTER y QUER, tras su administración oral e intravenosa, en ratones C57BL/6J.
2. Estudiar los efectos de la asociación de t-PTER y QUER a concentraciones biodisponibles sobre la interacción entre las células de melanoma B16-F10 y las células endoteliales *in vitro*.
3. Determinar si la asociación de t-PTER y QUER presenta un efecto antitumoral *in vivo*, en ratones portadores de melanoma B16M-F10 y en su caso, si dicho efecto afecta a la supervivencia de los animales de experimentación.

4. En su caso, estudiar el mecanismo antitumoral inducido por los polifenoles.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Sustrato biológico

1.1.1. Animales de experimentación

En los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones machos C57BL/6J de Charles River España (Barcelona, España), cuya edad estaba comprendida entre 6 y 8 semanas. Los animales se estabularon a temperatura estable entre 21-23 ° C, con una humedad relativa del 40-60%, con ciclos luz/oscuridad de 12 horas y cumpliendo con la normativa internacional vigente (Dirección de la CEE 86/609, OJ L358.1, 12 de Diciembre de 1987 y Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, NIH. Publ. No. 85-23, 1985).

Una vez recepcionados en el estabulario, los animales se aclimataron a su nuevo ambiente durante 15 días antes de comenzar los experimentos.

1.1.2. Cultivo de las células de melanoma B16M

El melanoma B16 es un tumor maligno muy indiferenciado que fue aislado en los laboratorios Jackson (Maine, U.S.A.) en 1954, a partir de un tumor espontáneo surgido en la piel de un ratón de la cepa C57BL/6J. En 1972, partiendo de esta cepa primitiva, I.J. Fidler obtuvo variantes celulares con diferente potencial metastático mediante implantes reiterados vía intravenosa, de las células tumorales obtenidas de los focos metastáticos pulmonares. De este modo, se seleccionó una línea celular con elevada capacidad metastática conocida como B16M-F10, obtenida tras 10 ciclos de inoculación reiterada (Fidler, 1973).

1.2. Materiales e instrumental de laboratorio

- **Agitadores**

De tubos vortex, marca TechnoKartell, modelo TK3S.

Magnético, con calefacción, marca Tecknocartell, modelo Agimatic.

Orbital, marca Ovan, modelo Orbital mini

- **Analizador de NO**

Marca Sievers, modelo NOA 208i

- **Autoclave**

Marca Selecta, modelo Sterilmax

- **Balanzas**

De precisión, marca A&D Company Limited, modelo ER120-A

Electrónica, marca A&D Company Limited, modelo K-200G

- **Baños**

Termostatzado y de agitación mecánica, marca SBS Instruments S.A., modelo BT-21 Serie B.

Con ultrasonidos, marca Selecta JP, modelo Ultrasons-H.

- **Bomba de vacío**

Marca Boc Edwards, modelo E2 M28.

- **Bomba peristáltica**

Marca LKB-Bromma, modelo multiperpex (tipo 2115)

- **Centrífugas**

Centrífuga sin refrigeración, marca ALC International, modelo micro centrifugette 4214.

Centrífuga refrigerada de alta velocidad, marca ALC Internacional, modelo 4239R.

- **Citómetro de flujo**

Marca Becton Dickinson, modelo FACScan.

- **Contador de centelleo**

Líquido, marca Packard, modelo Tri-Carb 2700TR Varisette.

- **Contador de radiactividad**

Marca Bioscan Inc., modelo AR-2000.

- **Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia**

Cromatógrafo, marca Shimadzu que consta de:

Bomba cromatográfica cuaternaria LC-10Advp

Autoinyector SIL-10Avp

Módulo de control SCL- 10Avp

Detector: Espectómetro de masas Quattro Micro de triple cuadrupolo, marca Micromass.

- **Equipamiento del laboratorio de cultivo**

Cabina de flujo laminar vertical, marca Telstar, modelo AV-100.

Cabina de flujo laminar vertical, marca Telstar, modelo BIOII-A.

Incubador termostatzado, marca Telstar, con gaseo de CO₂ y aire.

Material estéril para los cultivos (placas, pipetas Pasteur, tubos...).

- **Equipo de electroforesis y Western blot**

Fuente de alimentación para electroforesis, marca Bio-rad, modelo 200/2.0.

Lámpara de luz UV, marca Spectroline, modelo ENF 280 C/F

Equipo de documentación de geles, marca BioRad, modelo GelDoc

Película fotográfica, marca Fujifilm, modelo NAS-1000

Revelador, marca AGFA, modelo CURIX60

Densitómetro láser F, marca Molecular Dynamics

- **Espectómetro RMN**

Avance DRX Bruker 300Mhz

- **Espectofotómetro uv-visible**

Marca Cecil

- **Filtros**

Marca Waters, modelo GHP de 0,2 μ m y 13mm de diámetro.

- **Generador de hielo**

Marca Castellfranco, modelo Icematic F100 AX2.

- **Homogeneizador**

Marca Sorvall, modelo Omnicmixer.

- **Lector de placas de fluorescencia**

Marca Labsystem, modelo Fluoroskan Ascent FL.

- **Liofilizador**

Marca Virtis, modelo Benchtop 3L.

- **Material de vidrio**

Erlenmeyers, matraces, probetas, placa de cristalización, varillas de vidrio, embudo de sólidos y de líquidos, vidrio de reloj, refrigerantes, jeringas, varillas.

- **Microscopios**

De fluorescencia, marca Nikon, modelo Diaphot 300

Microscopio intravital de la marca Nikon, modelo Eclipse E600FN, con cámara de vídeo digital modelo DXM 1200, marca Nikon

- **PH-metro**

Marca Crison, modelo Microph 2001

- **Pipetas automáticas**

Marca Finnpipette, modelo Focus GLP

- **Placa termostatzada**

Marca Selecta, modelo Agimatic-N

- **Rotavapor con baño termostatzado**

Marca Buchi, modelo R-200

- **Sistema de electroporación**

Marca Biorad, modelo Gene Pulser I

- **Termómetro**

Para reacciones químicas, con control de temperatura, desde -20 °C hasta 300°C. Marca IKA Labortechnik, modelo ETS-D2

1.3. Reactivos y productos químicos

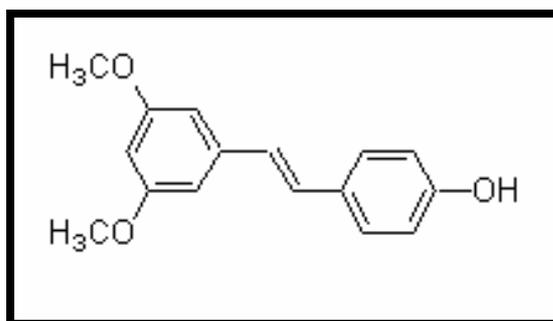
Todos los reactivos y enzimas que se han utilizado en el presente trabajo de investigación son de calidad reconocida, con el grado suficiente de pureza y fueron de las siguientes firmas: Boëhringer (Manheim, Alemania), Chemsyn Laboratories (Kansas City, MO), Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich Química

(Madrid, España), Teknokra (Barcelona, España), Waters (Barcelona, España).

2. MÉTODOS

2.1. Síntesis del *t*-PTER

Figura 15: Estructura química del *t*-PTER



El *trans*-pterostilbeno (*t*-PTER, figura 15) es una olefina diarílica que presenta configuración *trans*.

De entre las posibles rutas de síntesis de olefinas se plantearon inicialmente dos métodos generales:

- Reacción de Wittig, en la que un iluro de fósforo reacciona con un aldehído para dar una olefina y óxido de trifenílfosfina.
- Reacción de Heck en la que un haluro de arilo reacciona con un alqueno para dar un producto de acoplamiento en presencia de un catalizador de paladio (Pd).

Mientras que la reacción de Wittig generalmente conduce a mezcla de alquenos *cis* y *trans*, la reacción de Heck conduce principalmente a productos *trans*. Dado que el pterostilbeno que deseamos obtener presenta esta configuración, la aproximación a su síntesis mediante la reacción de Heck resulta más conveniente.

2.1.1. Fundamento de la reacción de Heck

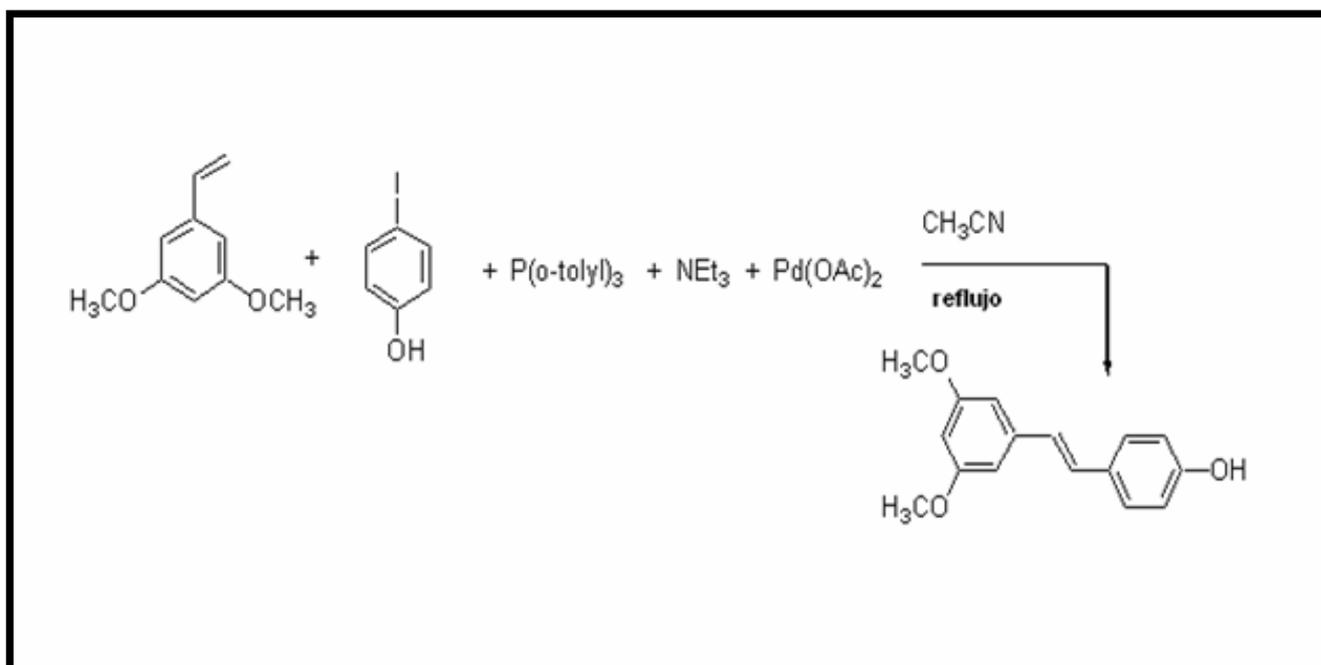
Es una de las reacciones más eficaces empleadas en la formación de enlaces C-C. En esta reacción se produce un acoplamiento entre haloarenos y haloalquenos con alquenos en presencia de compuestos de Pd (0) (Whitcombe y cols., 2001). La reacción se ha empleado con una gran variedad de sustratos y en numerosas síntesis de productos naturales y moléculas biológicamente activas.

Para la obtención de *t*-PTER, de las diferentes combinaciones posibles, se decidió emplear como sustratos de partida el *p*-yodofenol y el 3,5-dimetoxiestireno. Mientras que el primero es un reactivo comercial, el segundo no está disponible comercialmente, por lo que fue necesario llevar a cabo su síntesis. Ya que se trata de un alqueno monosustituido y por tanto, sin problema de estereoquímica, la reacción de Wittig permite acceder fácilmente a este producto.

Además, entre las posibles especies catalíticas de paladio el mejor resultado se obtuvo con el acetato de paladio, que permitió mayor rendimiento en la síntesis del producto deseado. Y de entre las diferentes fosfinas, empleamos la tri(*o*-tolil) fosfina, ya que nos permitió emplear el *p*-yodofenol con su grupo hidroxilo sin proteger.

En la figura 16 se muestra la reacción de Heck, aplicada a la obtención del *t*-PTER.

Figura 16: Reacción de Heck

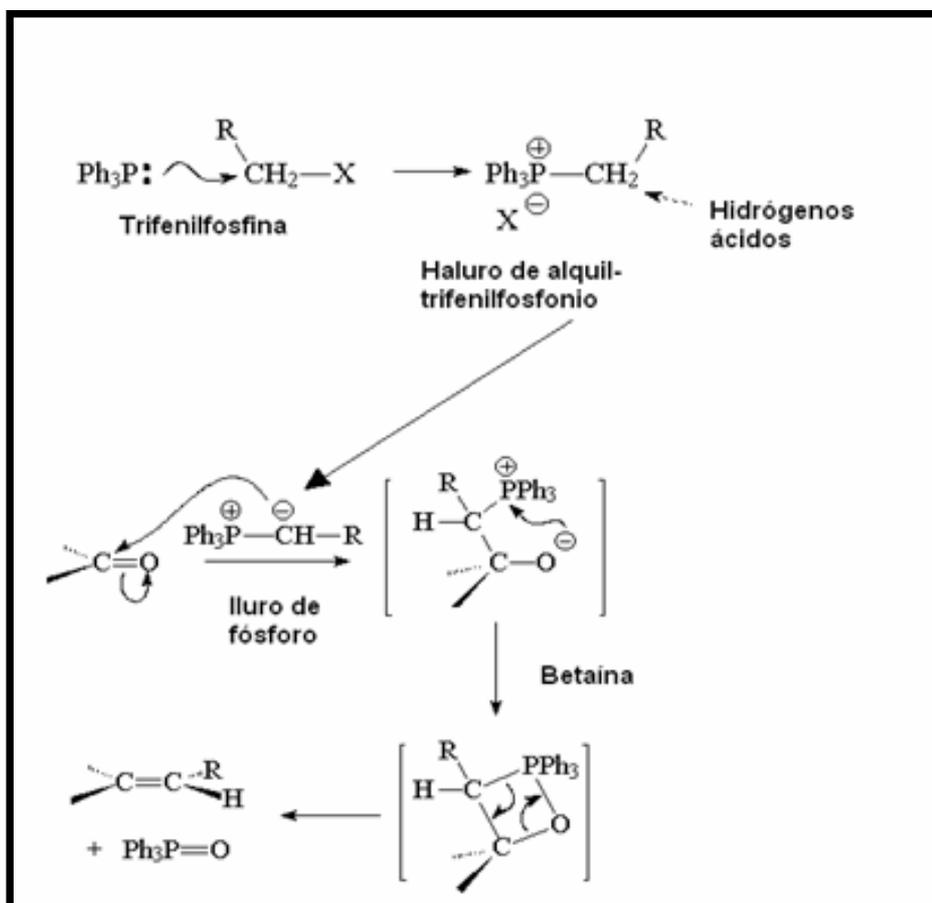


2.1.2. Fundamento de la reacción de Wittig

Está basada en un ataque nucleofílico de un iluro sobre un carbono carbonílico para formar una betaína (véase figura 17).

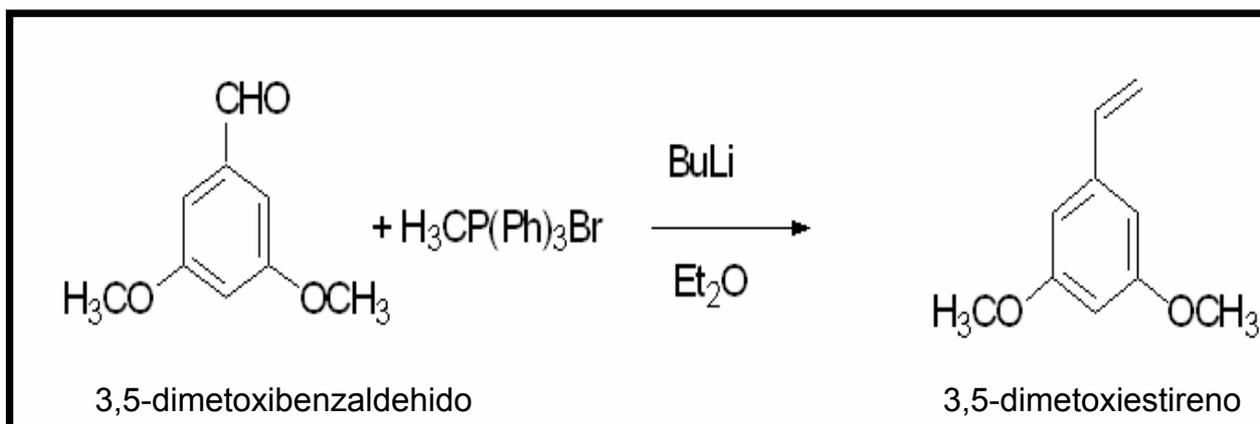
Posteriormente, ésta sufre una eliminación y se genera el alqueno de interés junto con óxido de trifenilfosfina (Pommer, 1977; Pommer y Thieme, 1983).

Figura 17: Mecanismo de la reacción de Wittig entre un aldehído o una cetona y un iluro de fósforo



En la figura 18 se muestra la reacción de Wittig aplicada a la obtención del 3,5-dimetoxiestireno, necesario para la obtención del *t*-PTER mediante la reacción de Heck.

Figura 18: Reacción de Wittig



2.1.3. Obtención del 3,5-dimetoxiestireno

2.1.3.1. Procedimiento

Esta reacción se realizó en condiciones anhidras, bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente.

En un matraz de fondo redondo (250 mL), el bromuro de metiltrifenilfosfonio (8,36 g, 23,46 mmoles) se suspendió en éter dietílico anhidro (60 mL).

Se añadió lentamente una disolución 2,5M de butil litio en hexano (9 mL, 22,56 mmoles). El cambio de color y viscosidad del crudo de reacción, nos indicó que la reacción había finalizado y esto ocurrió tras una hora.

Después, se adicionó el 3,5-dimetoxibenzaldehído (3 g, 18,05 mmoles) y se dejó reaccionar durante 4 horas. El resultado de la reacción fue una suspensión muy densa y blanquecina debido a la formación del óxido de trifenilfosfina. Para detener

la reacción, se añadió una disolución acuosa de cloruro amónico (100 mL), que disolvía la fosfina. Tras separar las fases, la fase orgánica resultante se lavó tres veces con acetato de etilo (100 mL), se reunieron las fases orgánicas y se secaron con sulfato sódico. Tras la filtración del sulfato, se evaporó el disolvente orgánico en el rotavapor.

2.1.3.2. Aislamiento y purificación

Previamente al proceso de purificación, se realizó una cromatografía en capa fina (CCF).

La CCF se llevó a cabo utilizando una placa de aluminio cubierta de sílice en una de sus caras. Una pequeña cantidad de muestra se disolvió en diclorometano y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa de sílice a cierta distancia del borde. La placa se depositó en un recipiente cerrado que contenía hexano: diclorometano (4:1). De este modo, el líquido iba ascendiendo por capilaridad. Finalmente, para visualizar los productos resultantes a partir de la reacción, la placa se reveló utilizando una lámpara de luz UV, donde se comprobaba la existencia de impurezas y del producto de interés que correspondía con el patrón de estireno que utilizábamos.

Una vez realizada la CCF del crudo de reacción, se purificó mediante destilación a vacío. Este proceso, consistió en un montaje de destilación utilizando una bomba de vacío.

2.1.3.3. Identificación

Para verificar la pureza del estireno obtenido, el resultado de la destilación se analizó por RMN (resonancia magnética nuclear) de protón, carbono 13 y DEPT y por espectrometría de masas, lo que confirmó la estructura y la pureza del 3,5-dimetoxiestireno (Casey y cols., 1990).

2.1.4. Obtención del t-PTER

2.1.4.1. Procedimiento

Esta reacción se realizó en condiciones anhidras, bajo atmósfera inerte y a reflujo.

En un matraz de fondo redondo (50 mL) se disolvió p-yodofenol (3,35 g, 15 mmol) en acetonitrilo (30 mL), se añadió trietilamina (2,16 mL) y tri(*o*-tolyl)fosfina (270 mg, 0,90 mmoles), el 3,5-dimetoxiestireno (2,5 g, 15,2 mmol) y por último, el acetato de paladio (22 mg, 0,1 mmoles) como catalizador.

La mezcla se agitó para disolver los componentes (solución marrón claro) y se llevó a reflujo manteniéndolo así 12 horas.

El resultado de la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó lentamente y bajo agitación, a un vaso de precipitados con ácido clorhídrico al 5% v/v (50 mL). La solución resultante se lavó tres veces con acetato de etilo (50 mL) y tras recoger la fase orgánica, se secó con sulfato sódico. Posteriormente se filtró y se evaporó el disolvente orgánico en el rotavapor.

2.1.4.2. Aislamiento y purificación

Se realizó una CCF, con el fin de comprobar la existencia de impurezas (véase apartado 2.1.3.2 de “Materiales y Métodos”).

Para aislar el *t*-PTER del resto de impurezas, se realizó una cromatografía en columna (CC). La elección de la longitud y grosor de la columna de vidrio empleada así como la elección del eluyente es crucial para un buen resultado cuando se emplea esta técnica de separación. En este caso, como fase estacionaria se usó gel de sílice (silicagel), embebido en eluyente (hexano: acetato de etilo; 8:1), que rellenaba la columna e iba compactándose sobre una capa de lana de vidrio.

A continuación, se introdujo la muestra por la parte superior de la columna mezclada con silicagel.

Posteriormente se hizo pasar de modo continuo más eluyente que iba descendiendo por efecto de la gravedad con el fin de obtener distintas fracciones de eluato.

Cada fracción se separó y se analizó mediante una CCF, para seleccionar las fracciones que contenían el *t*-PTER.

2.1.4.3. Identificación

Para verificar la pureza del *t*-PTER, la muestra obtenida se analizó por RMN (resonancia magnética nuclear) de protón, carbono 13 y DEPT y por espectrometría de masas, lo que confirmó la estructura y la pureza del *t*-PTER (Casey y cols., 1990)

2.2. Administración *in vivo* de *t*-pterostilbeno y quercetina

2.2.1. Fundamento

La administración *in vivo* de *t*-PTER y QUER se realizó para determinar los parámetros farmacocinéticos tras su administración oral e intravenosa.

2.2.2. Procedimiento

2.2.2.1. Administración intravenosa

Se administró a ratones machos C57BL/6J de 6-8 semanas, 20mg de t-PTER (disuelto en 0,5ml de etanol) /kg de ratón, y 20mg de QUER [disuelto en 0.15ml DMSO/solución fisiológica (2:1)] /kg de ratón. Además se realizaron grupos de ratones control, a los que se les administró vía intravenosa cada uno de los vehículos utilizados. La administración se efectuó a través de la vena yugular, donde se fijó previamente un catéter.

2.2.2.2. Administración oral

Se administró a ratones machos C57BL/6J, 20mg de t-PTER (disuelto en 0,5ml de etanol) /kg de ratón y 20mg de QUER [disuelto en 0.15ml DMSO/solución fisiológica (2:1)] /kg de ratón. Además se realizaron grupos de ratones control. A los que se les administró vía oral cada uno de los vehículos.

La administración oral se llevó a cabo utilizando una cánula intragástrica de dimensiones adecuadas para los ratones.

2.3. Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (HPLC-MS/MS)

2.3.1. Fundamento

Para la determinación de compuestos en muestras biológicas se desarrolló una técnica de HPLC-MS/MS en la cual, la muestra (en estado líquido) se hizo pasar a través de una columna cromatográfica a elevadas presiones (HPLC) y siendo los eluatos resultantes detectados por espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS/MS). Se podía determinar así, los polifenoles presentes en la muestra, por su tiempo de retención y según las transiciones de los pesos moleculares (PM) de cada compuesto, transiciones que correspondían a los PM de cada compuesto sin fragmentar y a los pesos de las moléculas hijas resultantes de su fragmentación en la cámara de colisión. Con el fin de lograr una mayor sensibilidad y selectividad.

2.3.2. Procedimiento de determinación de los distintos compuestos

2.3.2.1. Determinación de *t*-PTER y QUER

2.3.2.1.1. Preparación de las muestras biológicas

Cada muestra de sangre se recogió mediante un catéter utilizando una jeringa de 1ml de volumen que contenía heparina sódica (0,05 ml de heparina al 5% con 6,9% de NaCl). La sangre heparinizada se centrifugó a 1000 rpm a 4C°,

durante 10 minutos. Se separaron 200µl de plasma y se desproteinizó para su análisis mediante HPLC/MS-MS. Para ello, se empleó 600µl de acetonitrilo frío. Posteriormente se agitó y se centrifugó a 15.000 rpm. El sobrenadante se filtró con un microfiltro (0,2 µM de diámetro de poro) con el fin de eliminar las partículas que pudieran interferir en el análisis.

Para determinar los polifenoles en cada órgano se separaron 100mg del tejido y se homogeneizó en 1ml de agua bidestilada. Se separaron 100µl de la suspensión tisular y se añadieron 200µl de acetonitrilo, se agitó y se centrifugó a 15.000 rpm. El sobrenadante se filtró y se analizó mediante HPLC-MS/MS.

2.3.2.1.2. Condiciones del análisis por HPLC/MS-MS

La técnica cromatográfica fue en fase reversa, utilizándose una columna cromatográfica *Phenomenex Prodigy C18* (100 x 2mm) con un tamaño de partícula de 3µm. El volumen de inyección fue de 40µl con un flujo de 0,2ml/min y a temperatura ambiente.

El proceso cromatográfico se realizó con el gradiente de elución que se muestra en la tabla 1:

Tabla 1: Gradiente de elución

Tiempo (min)	A%	B%	C%
0	5	5	90
10	5	5	90
20	5	90	5
30	100	0	0
40	5	5	90

Eluyentes:

A: Metanol

B: 10% de acetonitrilo y 90% de 10mM de formiato amónico

C: 10 mM de formiato amónico a pH=3,75

Las condiciones empleadas para la espectrometría fueron las expuestas en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones para la espectrometría de masas

Electrospray	Negativo (ES-)
Energía del capilar	3,5 KeV
Temperatura de la fuente	120 °C
Gas de secado/nebulización	Nitrógeno (flujo: 300 y 30 l/h)
Gas de colisión	Argón ($1,5 \times 10^{-3}$ mbar)

Las transiciones seleccionadas para la determinación del *t*-PTER y QUER con sus respectivas energías de colisión e ionización se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Transiciones seleccionadas

Compuesto	Transición	E.Cono (Ev)	E.Colisión (eV)	Tpo.Retención (min)
QUER	300-151	30	20	34,83
t-PTER	255-240	30	20	37,29

Las distintas concentraciones de cada compuesto se determinaron realizando previamente una curva de calibración, que abarcaba valores de concentraciones entre 0,01-100 μ M

de *t*-PTER y QUER. En todos los casos, se obtuvo un coeficiente de correlación >0,99.

2.3.2.2. Determinación de C₁₆-ceramida

2.3.2.2.1. Preparación de las muestras biológicas

La cantidad de ceramida en células B16M-F10 se midió como fue descrito previamente (Soeda, 2001). De este modo, la suspensión de células (5×10^6 células en 200 μ l de DMEM) se agitó vigorosamente con cloroformo/metanol (2:1, v/v) durante 20 min.

Posteriormente se añadió 0,8ml de agua destilada a la mezcla y la muestra se vortió y se centrifugó. La fase orgánica se recogió y se evaporó el cloroformo. El residuo resultante se redisolvió en metanol y fue analizado por HPLC-MS/MS.

2.3.2.2.2. Condiciones del análisis por HPLC/MS-MS

Se utilizó una columna cromatográfica *Phenomenex* C18 (35 x 2mm) con un tamaño de partícula de 5 μ m. El volumen de inyección fue de 40 μ l con un flujo de 0,2ml/min y la temperatura que se utilizó para trabajar fue de 25°C aprox.

El proceso cromatográfico se realizó con el gradiente de elución que se muestra en la tabla 4.

Tabla 4: Gradiente de elución

Tiempo (min)	A %	B %
0	70	30
2	50	50
4	30	70
6	0	100

Eluyentes:

A: 5mM de formiato amónico/metanol/tetrahidrofurano (5:2:3)
v/v

B: 5mM de formiato amónico/metanol/tetrahidrofurano (1:2:7)
v/v

Las condiciones empleadas para la espectrometría de masas fueron las expuestas en la tabla 5:

Tabla 5: Condiciones para la espectrometría de masas

Electrospray	Positivo (ES+)
Energía del capilar	4 KeV
Temperatura de la fuente	400°C
Gas de secado/nebulización	Nitrógeno (flujo: 80 y 30 l/h)
Gas de colisión	Argón ($1,5 \times 10^{-3}$ mbar)

Las transición seleccionada para la determinación de C₁₆-ceramida con su respectiva energía de colisión e ionización se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Transiciones seleccionadas

Compuesto	Transición	E. Cono(eV)	E.Colisión(eV)	Tpo.Retención (min)
C ₁₆ Cer	538-264	30 Ev	29 eV	4

Las distintas concentraciones de este compuesto se determinaron, realizando previamente una curva de calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,01-100 µM. En todos los casos, se obtuvo un coeficiente de correlación >0,99.

2.4. Cultivos de células B16M-F10 e inhibición del crecimiento tumoral *in vitro*

2.4.1. Fundamento

El cultivo celular es un método para el estudio del comportamiento de las células que están libres de variaciones sistémicas propias de los organismos.

Esta metodología permite comprobar el posible efecto citostático y citotóxico de *t*-PTER y QUER al añadirlos al medio de cultivo de las células tumorales.

2.4.2. Procedimiento

La línea celular que se utilizó fue la línea de melanoma murino B16M-F10, variante altamente metastásica que se estableció a partir de la línea original B16. Éstas se cultivaron con DMEM (Invitrogen) a pH 7,4, suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y un 0,1% de fungizona (antimicótico líquido que contiene 250µg de anfotericina B y 205 µg de desoxicolato sódico/ml en agua destilada). Las células sembradas se incubaron en estufa húmeda a 37° C y una atmósfera del 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Todo el procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.

2.4.3. Cálculos

Tras la incubación de las células B16M-F10 con los polifenoles se estudió la tasa de crecimiento y la viabilidad de los cultivos de células tumorales utilizando el test de exclusión con azul tripano y el posterior conteo con la cámara de Neubauer (Bergmeyer, 1985).

2.5. Aislamiento y cultivo de las células del HSE

2.5.1. Fundamento

Las células del endotelio sinusoidal hepático (HSE) se separaron e identificaron como describió Vidal-Vanaclocha y cols., en 1993. Las células aisladas se utilizan para los ensayos de adhesión *in vitro* de las células tumorales al endotelio.

2.5.2. Procedimiento

Para realizar el lavado hepático y para las soluciones enzimáticas, se utilizó una solución salina de Krebs-Henseleit a 37°C y a pH fisiológico que se perfundió a través del hígado en sentido cava-porta.

La **composición de esta solución** salina fue la siguiente:

- 100 partes de cloruro sódico 0.9 % (p/v)
- 4 partes de cloruro potásico 1.15 % (p/v)
- 3 partes de cloruro cálcico 0.11 % (p/v)
- 1 parte de fosfato monopotásico 2.11 % (p/v)
- 1 parte de sulfato magnésico 2.11 % (p/v)
- 21 partes de bicarbonato sódico 1.3 % (p/v)

Esta solución fue gaseada previamente con una mezcla de CO₂:O₂ (5:95, v/v) durante 30 minutos hasta alcanzar un pH de 7,4 y durante todo el proceso de perfusión, se mantuvo gaseándose.

Además con este tampón se prepararon las siguientes soluciones enzimáticas:

A: 10 ml de pronasa tipo E al 0,1% (p/v).

B: 15 ml de pronasa al 0,033% y colagenasa A al 0,083% (p/v).

C: 13 ml de pronasa al 0,038%, colagenasa A al 0,038% y DNAasa I al 0,0005% (desoxirribonucleasa tipo I) (p/v).

Para llevar a cabo la digestión enzimática y la disgregación del tejido, los animales fueron anestesiados con 150 mg/Kg de quetamina y 5 mg/kg de acepromacina.

Esta última además de actuar como anestésico actuaba como tranquilizante. Ambos fármacos se administraron por inyección intraperitoneal de forma conjunta en una sola inyección, que contenía 0,07ml del primero y 0,01ml del segundo, dado que el peso de los ratones oscilaba entre 25 y 28g.

Se perfundió el hígado con solución Krebs-Henseleit y tras el lavado se perfundieron sucesivamente las soluciones A y B. Finalizada la digestión enzimática se extrajo el hígado y se disgregó mecánicamente. El disgregado se resuspendió en la solución C, en la que se mantuvo 10-15 minutos en agitación. Tras esta última digestión enzimática, se diluyó la solución con tampón Krebs-Henseleit y se filtró todo el volumen a través de un tamiz. Este filtrado se centrifugó a 450g durante 5 minutos a 4°C.

Para realizar el aislamiento de las células sinusoidales hepáticas (HSE) se realizó un gradiente isopícnico de metrizamida. Tras eliminar los fragmentos tisulares y celulares derivados de la digestión enzimática, el sedimento celular se resuspendió en 2,5ml de tampón Krebs-Henseleit. Este volumen se mezcló con 3,5 ml de metrizamida al 30% previamente disuelta en Krebs-Henseleit y se centrifugó a 950g durante 15min a 20°C. A continuación se recogieron las células situadas en la parte superior del gradiente. Las células separadas se resuspendieron en 50ml de DMEM y se centrifugaron a 450g durante 10min a 4°C. El sedimento celular

se resuspendió en un pequeño volumen de DMEM para calcular la proporción de células viables mediante el test de exclusión de azul tripano (Bergmeyer, 1985).

Para el cultivo de las células HSE se utilizaron placas de 12 pocillos con una matriz de colágeno tipo I al 1% (2ml/pocillo). Las células sembradas se mantuvieron 2 horas en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂. En este periodo de tiempo, son las células endoteliales las que, por adhesión diferencial, quedan unidas a la matriz de colágeno, obteniéndose tras los lavados con PBS, un cultivo casi exclusivo de células endoteliales libres de otros tipos de células sinusoidales como células de Kupffer, células estrelladas y linfocitos (Carretero y cols, 2001).

Las células HSE se mantuvieron en el medio de cultivo durante al menos 12 horas. En estas condiciones, las células podían ser mantenidas de 4 a 5 días como máximo a partir de los cuales, comenzaban a perder sus características fenotípicas. Antes de la realización de cualquier experimento las células fueron mantenidas en medio sin suero durante al menos 4 horas.

2.6. Ensayo de adhesión y de citotoxicidad inducida por el endotelio

2.6.1. Fundamento

Estos ensayos permiten por un lado, la cuantificación de la adhesión tumoral de las células B16M-F10 al HSE *in vitro* en presencia de *t*-PTER y QUER. Y por otra parte, el daño que sufren las células B16M-F10 durante dicha interacción. Para ello, se utilizó la metodología que fue descrita por Anasagasti y cols. (1998).

Durante la interacción *in vivo* de las células metastáticas con el endotelio y las células de Kupffer, se produce una liberación local de citoquinas proinflamatorias que promueven la adhesión de las células tumorales al endotelio (Orr y cols, 2000). Por ello, este modelo *in vitro* se realizó en presencia de IFN- γ y TNF- α , para lograr la activación del endotelio (Carretero y cols, 2001).

2.6.2. Preparación de citoquinas

Partimos de TNF- α (2×10^7 U/mg de proteína) y IFN- γ (10^5 U/mg proteína) de Sigma.

Preparamos las siguientes soluciones madre: 5×10^5 U TNF- α /ml y 25×10^4 U IFN- γ /ml, diluidas en suero fisiológico (0,9% NaCl) a pH 7 y conservado a 4° C.

2.6.3. Procedimiento

Tras la aplicación de *t*-PTER y QUER sobre los cultivos de las B16M-F10 durante un tiempo determinado, cada 24 horas, se lavaron tres veces con PBS y se añadió medio fresco. Transcurridas 72 horas, se incubaron con 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-6-carboxifluoresceína-acetoximetiléster (BCECF-AM) (10^6 células en 1ml de DMEM y con 50 μ g/ml de BCECF-AM y 5 μ l de DMSO, durante 20 minutos a 37°C). Tras lavar con PBS, las células marcadas con BCECF-AM, se resuspendieron en DMEM sin rojo fenol, a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml; 0,2ml de esta suspensión celular, se añadió a los pocillos que contenían células endoteliales sembradas 24 horas antes en ausencia o presencia de *t*-PTER y QUER durante una hora. En todos los casos las citoquinas (100 U/ml TNF- α y 50 U/ml IFN- γ) se añadieron a las células HSE 12 horas antes del cocultivo. Las células tumorales también se añadieron a pocillos sin ningún tratamiento polifenólico y a pocillos sin células HSE, para el cálculo de la adhesión inespecífica de las células tumorales sobre la matriz de colágeno tipo I.

Los cocultivos se incubaron durante 20 minutos a 37° C. Previamente se había medido la fluorescencia inicial y tras la incubación se realizaron 3 lavados con medio fresco para eliminar las células tumorales no adheridas a la monocapa de células endoteliales. Después de añadir medio fresco se volvió

a medir la fluorescencia emitida. Para estas detecciones fluorimétricas se utilizó un lector de placas y una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 530nm.

Los estudios de viabilidad de las B16M-F10 durante su adhesión con el HSE, se realizaron tras 6 horas de cocultivo, utilizando el kit comercial Calceína-AM (Molecular Probes), que marca específicamente las células vivas.

Las células tumorales fueron incubadas antes del cocultivo con el marcador calceína-AM durante 15 minutos a 37°C (Anasagasti y cols, 1998).

2.6.4. Cálculos

2.6.4.1. Estudio de la adhesión

El cálculo de los porcentajes finales de adhesión se realizó de la siguiente manera:

Autofluorescencia del medio de cultivo (AF): intensidad media de la fluorescencia emitida por los pocillos que sólo contenían medio.

Superficie ocupada por las células endoteliales (SE): área de la placa ocupada por la monocapa celular. No se realizó ningún experimento con cultivos de células endoteliales que ocuparan una superficie menor del 70%.

% Adhesión inespecífica (AI): [(intensidad media de fluorescencia emitida por las células tumorales adheridas sobre la base de la placa tratada con colágeno – AF)/ (intensidad media de fluorescencia emitida por las células totales añadidas a cada pocillo – AF)] x 100

% Adhesión total (AT): (intensidad media de fluorescencia de las células tumorales adheridas a las células endoteliales/intensidad media de fluorescencia emitida por las células totales añadidas a cada pocillo) x 100

% Adhesión específica (AE) = AT – (AI x SE)

2.6.4.2. Estudio de la citotoxicidad

La citotoxicidad relativa se calculó de la siguiente manera:

(Fluorescencia de B16M-F10 añadidas al sustrato celular/fluorescencia de las B16M adheridas a la placa tratada con colágeno) x 100.

2.7 Ensayo de invasión *in vitro*

2.7.1. Fundamento

La invasión es el proceso mediante el cual, las células tumorales son capaces de penetrar en los tejidos normales y en los vasos sanguíneos y desde ahí producir metástasis. La

invasión no es debida sólo a la presión del crecimiento tumoral, sino a características fenotípicas que adquieren las células cancerosas.

En este ensayo, la invasión de las células B16M-F10 sobre la monocapa de células del HSE, se estudió de acuerdo con el método de Ohigashi y cols. (1989), con algunas modificaciones.

2.7.2. Procedimiento

Las células del HSE fueron sembradas sobre una matriz de gelatina al 1%. Cuando las células confluyeron, el medio de cultivo se reemplazó por un medio fresco. Después de dos horas de incubación, el cultivo se lavó con DMEM y las células B16M-F10 se cultivaron sobre el estrato de células del HSE durante 5 días.

2.7.3. Cálculos

La capacidad de invasión de las células B16M-F10 fue medida, contando el nº de colonias/cm² formadas por debajo de la monocapa en la matriz de gelatina por microscopia de contraste de fases.

2.8. Determinación de la expresión de VLA-4 y VCAM-1 por citometría de flujo

2.8.1. Fundamento

La citometría de flujo es una técnica destinada a la cuantificación de componentes intra o extracelulares mediante métodos fluorimétricos. De este modo, la expresión de las moléculas de adhesión intercelular se analizó utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (Okara y cols, 1994).

2.8.2. Procedimiento

Se realizó un cocultivo de células del HSE con células B16M-F10, ambas tratadas con polifenoles como se muestra en el apartado anterior. Tras 20 minutos de cocultivo se separaron los dos tipos celulares, se lavaron dos veces con PBS en frío y se resuspendieron en DMEM antes de empezar la incubación con anticuerpos.

Las células de B16M-F10 (1×10^6) se incubaron con $1 \mu\text{g}$ anticuerpo monoclonal contra el *very late activation antigen 4* (VLA-4) de ratón (IgG2b desarrollado en rata; Serotec, Oxford, UK) durante 1 hora a 4°C , mientras que las células HSE (1×10^6) se incubaron con $2 \mu\text{g}$ anticuerpo monoclonal contra la *vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1) (IgG desarrollado en rata, Kappa; R&D Systems Minneapolis, MN). Tanto las células

de B16M-F10 como las del endotelio se lavaron con PBS dos veces y posteriormente fueron tratadas con anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína isocianato durante 1 hora a 4° C.

2.8.3. Cálculos

Después de lavar con PBS dos veces, las células (10.000 células por condición experimental), fueron analizadas por el citómetro de flujo (Becton Dickinson) utilizando un láser de ión argón sintonizado a 488 nm.

La viabilidad, determinada mediante la captación de yoduro de propidio, demostró que ambos tipos de células no fueron afectadas por la manipulación experimental.

2.9. Técnica de RT-PCR

2.9.1. Fundamento

Esta técnica consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de múltiples copias de cDNA que proviene de una reacción de retrotranscripción a partir de RNA total, con el fin de estudiar la expresión de determinados genes en las células del HSE y en células tumorales.

2.9.2. Procedimiento

El total de RNA se aisló usando el kit Trizol (Invitrogen) siguiéndose las instrucciones del fabricante. El cDNA se obtuvo usando un cebador *random hexamer* y un kit de transcriptasa inversa *MultiScribe*, como especificaba el fabricante (*TaqMan RT Reagents; Applied Biosystems*).

A la mezcla de reacción de PCR (*SYBR Green PCR master mix*) y los correspondientes cDNA problema (*Applied Biosystems*) se añadieron los cebadores específicos mostrados a continuación, con el fin de amplificar los cDNA correspondientes a diferentes RNA mensajeros de genes que expresan proteínas pro y antiapoptóticas y proteínas enzimáticas implicadas en la síntesis de NO (eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial y la iNOS, óxido nítrico sintasa inducible):

BAX: forward 5'- AAGCTGAGCGAGGTGCTCCGGCG

reverse 5'-GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC

BAK: forward 5'-AGTGAGGGCAGAGGTGAGAGTTA

reverse 5'-CACAGTTGCTTCTGCTGGAGTAGTT

BAD: forward 5'-CCAGTGAATCTTCTGCTCCACATCCC

reverse 5'-CAACTTAGCACAGGCACCCGAGGG

BID: forward 5'-ACAAGGCCATGCTGATAATGACAAT

reverse 5'-CAGATACACTCAAGCTGAACGCAG

Bcl-2: forward 5'-CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG

reverse 5'-CAGATGCCGGTTCAGGTAICTCAGTC

Bcl-w: forward 5'-CGAGTTTGAGACCCGTTTCCGCC

reverse 5'-GCACTTGTCCCACCAAAGGCTCC

Bcl-xL: forward 5'-TGGAGTAAACTGGGGGTCGCATCG

reverse 5'-AGCCACCGTCATGCCCGTCAGG

iNOS: forward 5'-CGGATATCTCTTGCAAGTCCAAA

reverse 5'-AAGTATGTGTCTGCAGATATG

eNOS: forward 5'-CACCAGGAAGAAGACCTTTAAGGA

reverse 5'-CACACGCTTCGCCATCAC

Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa (GADPH):

forward 5'-CCTGGAGAAACCTGCCCGTCAGG

reverse 5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCCAAGATG

La cuantificación en tiempo real de cada cDNA relativo al cDNA de la GADPH (gen de expresión constitutiva que se utiliza como referencia), se llevó a cabo monitorizando a tiempo real la formación de los amplicones teñidos con el fluorocromo y con un sistema de detección *SYBR Green iCycler* (BioRad).

Esta amplificación llevada a cabo en tubos separados, se realizó siguiendo el protocolo de PCR mostrado en la figura 19:

Figura 19: Protocolo de PCR

1º) 10 minutos a 95°C		
	30	segundos
	95°C	
2º) 40 ciclos ---- Cada ciclo:	(desnaturalización)	
	1 minuto 60°C (amplificación)	

El incremento de fluorescencia se midió durante el paso de la extensión del DNA.

2.9.3. Cálculos

El *threshold cycle* (Ct) o ciclo a partir del cual la amplificación sigue una cinética lineal, es el parámetro que permitió calcular el *fold change* (Fc), es decir, el nº de veces que cambia la expresión de la condición “tratada” con respecto “control” (véase figura 20).

Figura 20: Cálculos de la expresión de los genes

$$F_c = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ diana} - Ct \text{ GAPDH y}$$

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ tratado} - \Delta Ct \text{ control}$$

2.10. Metástasis experimental

2.10.1. Fundamento

Consiste en inducir la formación de metástasis en el hígado del ratón a partir de células tumorales inyectadas vía i.v., con el fin de estudiar el efecto de los polifenoles sobre este proceso. Se siguió la metodología descrita por Anasagasti y cols. (1998)

2.10.2. Procedimiento

La metástasis hepática se indujo mediante la inyección de 4×10^5 células de melanoma B16M-F10 y células B16M-F10/Tet-Bcl-2, suspendidas en 0,2ml DMEM, en la vena porta a ratones que fueron anestesiados con Nembutal (50mg/kg peso del ratón). 24h después de la inoculación los ratones recibieron diariamente una dosis de 20 mg de *t*-PTER y QUER/kg de peso, durante un periodo de 10 días.

Transcurridos los 10 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Los hígados se fijaron por inmersión en

paraformaldehido al 4% en PBS (pH 7,4) durante 24 horas a 4° C, tras lo cual se incluyeron en parafina. Las muestras en parafina se procesaron con el microtomo obteniendo cortes de entre 5-10 μm . Se extendieron sobre una gota de gelatina a 37°C y se recogieron en portaobjetos (Menzel-Glaser) gelatinizados.

Sobre dichos cortes se realizó el marcaje inmunohistoquímico de las células tumorales con el anticuerpo de conejo S-100 (Dako) (1:100, el anticuerpo marca las células de melanoma maligno) (Vanstapel y cols., 1986). El anticuerpo secundario era contra conejo unido a HRP (Amersham Life Science). Para favorecer el reconocimiento del epítipo por el anticuerpo, se calentaron los portaobjetos con los cortes, sumergidos en tampón citrato 10mM, a 120 ° C durante 18 segundos.

2.10.3. Cálculos

Se calculó tanto la densidad metastásica (número medio de nódulos metastásicos/100mm³ de hígado detectado en 15 secciones de 10x10 mm²) como el volumen metastásico (% medio de volumen de hígado ocupado por la metástasis) (Carretero y cols., 1999).

2.11. Microscopía *in vivo*

Para seguir la dinámica de las células tumorales dentro del hígado se utilizó la técnica de microscopía intravital (Eclipse E600FN, equipado con una cámara digital DXM1200 (Nikon)) por Anasagasti y cols. (1998), inoculando vía portal células tumorales previamente marcadas con el fluorocromo calceína-AM. El total de células marcadas con calceína-AM por lóbulo hepático se contabilizó a intervalos de 15 minutos cada 6 horas.

2.12. Aislamiento de las células B16M-F10 a partir de las metástasis hepáticas

Las B16M-F10 invasivas fueron aisladas como previamente se había descrito (Ortega y cols, 2003). Una vez disgregado el tejido metastásico con la misma metodología descrita en el apartado 2.5, la suspensión celular se incubó con el anticuerpo monoclonal murino anti-Met 72. El anticuerpo reacciona con una proteína de superficie de membrana de 72 KDa (Met-72) que se expresa en los clones de B16M con elevada actividad metastásica (Kimura y Xiang, 1986). La detección de la unión antígeno-anticuerpo se llevó a cabo con un anticuerpo secundario de oveja (anti ratón) conjugado con FITC (Cappel Laboratories), de manera que las células de B16M-F10 quedaron marcadas con fluorescencia y pudieron ser

separadas mediante “cell sorting” (MoFlo System, Dako Cytomation) (Ortega y cols., 2003b).

2.13. Análisis de la Bcl-2

2.13.1. Fundamento

La familia de proteínas Bcl-2 está formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. Su nombre deriva de la proteína fundadora, el protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), implicada en el bloqueo de la muerte celular por apoptosis.

Para su determinación se siguió la metodología descrita por Eissa y Seada (1998).

2.13.2. Procedimiento

Los niveles celulares de Bcl-2 se cuantificaron en la fracción soluble citosólica mediante un inmunoensayo enzimático (Eissa y Seada, 1998).

Primero se prepararon placas de 96 pocillos tratadas con estreptavidina (Chemicon) a las que se añadió 100µl de anticuerpo marcado con biotina [para la obtención de anticuerpo anti-Bcl-2 de ratón (Invitrogen) biotinilado, se utilizó

el kit de marcaje con biotina (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante].

Tras varios lavados con PBS, se realizó el bloqueo (3% BSA en PBS) durante 2 horas; seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron las muestras diluidas en tampón de bloqueo durante dos horas a T^a ambiente.

Después se incubaron las placas con un anticuerpo anti-Bcl-2 de conejo (5 µg/ml, Stressgen Biotechnologies) durante dos horas a T^a ambiente; se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (1:200, Amersham Life Science) durante una hora.

Tras varios lavados se realizó la reacción colorimétrica añadiendo 100 µl de una mezcla de TMB (Tetramethylbenzidine, Chemicon) con tampón de sustrato (Chemicon) con una relación 1:100. La reacción se paró añadiendo 100µl de la solución de parada (solución STOP) que contiene ácido sulfúrico 0,5 M (Chemicon).

2.13.3. Cálculos

La medición espectrofotométrica se realizó a 450nm. Se definió a una unidad de Bcl-2 como la cantidad de proteína Bcl-2 en 1000 células B16M.

2.14. Obtención de la línea estable B16M-F10/tet-Bcl-2

2.14.1. Fundamento

Este experimento se realizó para obtener células tumorales capaces de sobreexpresar *bcl-2* con el fin de estudiar la influencia de esta proteína sobre el efecto antitumoral de la combinación de *t*-PTER y QUER.

2.14.2. Procedimiento

Para sobreexpresar ectópicamente la proteína Bcl-2, se utilizó el sistema de expresión inducible Tet-off de Clontech. En este sistema, el primer componente crítico es una proteína reguladora basada en la proteína represora de Tet (TetR) de *E.coli*, fusionada con el extremo c-terminal del dominio de activación del virus Herpes Simplex VP16. Esta fusión convierte a TetR en un activador transcripcional y la proteína resultante híbrida es conocida como el transactivador controlado por tetraciclina (tTA). tTA está codificado por un plásmido regulador llamado pTet-off, el cual incluye un gen de resistencia a Neomicina que permite la selección de las células transfectadas. El segundo componente crítico es el plásmido de respuesta pTRE, que contiene la secuencia codificante de la proteína Bcl-2 murina bajo el control del elemento de respuesta a tetraciclina o TRE, y que además incluye también un gen de resistencia a la higromicina.

Las células B16M-F10 fueron transfectadas con el plásmido pTET mediante electroporación (BioRad system, 1.0 kV/cm con un tiempo constante de 50 msec). 24 horas después sometimos a las células a geneticina (0,5mg/ml). Una vez obtenidos los clones resistentes se transfectaron con el plásmido pTRE-Bcl-2, cultivándose a continuación en presencia de higromicina (0,2mg/ml). Para disminuir los niveles de la proteína Bcl-2 en células B16/Tet-Bcl-2, se cultivaron en presencia de 1 µg/ml de tetraciclina (Sigma).

2.15. Medida de H₂O₂ y NO

2.15.1. Fundamento

En este ensayo se comprueba el efecto de *t*-PTER y/o QUER sobre la producción de H₂O₂ y NO en células B16M-F10.

2.15.1.1. Medida de H₂O₂

Está basada en la reacción de oxidación H₂O₂-dependiente del ácido homovanílico (3-metoxi-4-hidroxifenilacético) para dar un dímero altamente fluorescente (2,2'-dihidroxifenil-5,5'-diacético), reacción mediada por la peroxidasa de rábano (Carretero y cols, 2001).

2.15.1.2. Medida de nitritos y nitratos

La determinación de nitritos y nitratos fue llevada a cabo por la metodología de Braman y Hendrix (1989).

2.15.2. Procedimiento y cálculos

2.15.2.1. Determinación de H₂O₂

Para la determinación de los niveles de H₂O₂, las células se cultivaron en presencia de 100µM de ácido homovanílico y 1U peroxidasa de rábano en DMEM sin rojo fenol durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se determinó la presencia de 2,2'-dihidroxifenil-5,5'-diacético utilizando una longitud de onda (λ) de excitación de 312nm y λ de emisión de 420nm. La relación entre la fluorescencia y la cantidad de H₂O₂ fue lineal en el rango de 0,1-12 nmol por 2ml de cultivo.

2.15.2.2. Determinación de nitratos y nitritos

El nivel de nitritos se llevó a cabo a partir de la monitorización de la aparición de NO mediante un analizador de NO (Siervers 280i).

Ésta se colocó en un reflujo de solución de yoduro/ácido acético, el cual, reducía los iones nitrito a NO. Los iones nitratos no se veían afectados.

La determinación del total de los iones nitrito y nitrato se realizó a partir de la monitorización de la aparición de NO a partir de una muestra situada en un reflujo de una solución de VCl_3 / HCl en ebullición, el cual, reduce ambos iones a NO.

La determinación de los nitratos se obtuvo restando a los valores de los iones totales los niveles de nitritos.

Para la cuantificación se realizó una curva de patrones a concentraciones conocidas de nitratos y nitritos.

2.16. Ratones eNOS-deficientes

2.16.1. Fundamento

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) es una enzima constitutiva del endotelio que sintetiza el NO. Este proceso se realiza a partir de la catálisis de la oxidación del amino guanidino de la L-arginina para generar NO y L-citrulina (Ghafourifar y Saavedra-Molina, 2004).

La generación de ratones deficientes para el gen que codifica la enzima eNOS se llevó a cabo por un método descrito previamente (Shesely 1996). Estos ratones se generaron con el fin de conocer la influencia de los polifenoles en los ratones que expresaban la eNOS y los que no podían expresarla.

2.16.2. Procedimiento

Se hibridaron los ratones eNOS deficientes heterocigotos (+/-) para obtener ratones homocigotos (-/-) y (+/+).

Se utilizaron los ratones eNOS (+/+) y ratones salvajes del tipo C57BL/6J como controles.

El genotipo de los animales se determinó por Southern blotting del DNA a partir de las biopsias tomadas de la cola.

La identificación de los ratones con genotipo eNOS (+/+) y eNOS (-/-) ha sido con la metodología descrita previamente (Shesely, 1996).

Así, 20µg del material genético procedente de las muestras se digirió con BamHI, se separó con gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nylon.

Se hibridó mediante un random primer de 1.4 kb de cDNA complementario del gen eNOS (Sheseley y cols, 1996).

Se diagnosticó a partir del locus eNOS endógeno, un fragmento de 5.3 kb y otro de 6.4 kb se diagnosticó a partir del alelo diana.

2.17. Medida de la actividad de iNOS en células B16M-F10

2.17.1. Fundamento

La enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es una enzima que sintetiza el NO y se expresa en respuesta a estímulos inmunológicos o inflamatorios. La conversión de L-arginina a L-citrulina dando NO, se midió por una modificación de la metodología descrita previamente (Rao 2000).

2.17.2. Procedimiento

El ensayo fue realizado mediante la adición de 100 µg de una muestra de proteína a 150µl de un tampón para este ensayo ((50mM HEPES, 1mM DTT, 1mM de MgCl₂ ,5 mg/l pepstatina A, 0,1mM fenilmetilsulfonil fluoruro y 3mg/l de aprotinina (pH 7,4)) en presencia de 70µM de arginina, 250,000 dpm L-[³H]arginina, 2mM NADPH, 5 µM tetrahidrobiopterina, 5 µM flavin adenina dinucleótido y 0.5 mM CaCl₂ para medir el total de la actividad de la NOS o en presencia de 1mM de EDTA (sin calcio) para determinar la actividad de la iNOS Ca²⁺-independiente. Después de 30 min a 37° C, la reacción se detuvo con 100 µl de una solución de ácido tricloroacético 1M.

La muestra se ajustó a un pH de 4,6 por adición de 500 µl de solución de HEPES 20mM y mediante una columna cromatografica se separaron los distintos productos.

2.17.3. Cálculos

La L-[³H]citrulina se separó y se detectó por contaje de radioactividad. Los resultados se expresan como pmol L-[³H]citrulina/mg proteína/min.

2.18. Análisis por Western Blot de CREB

2.18.1. Fundamento

Es un método utilizado para la determinación de proteínas en una muestra. Consiste en la separación de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y en la posterior transferencia a una membrana, donde son detectadas utilizando anticuerpos específicos.

En este ensayo se va a medir la presencia del factor de transcripción CREB fosforilado (P-CREB, activo) y sin fosforilar. Este factor de transcripción media la supervivencia de las células tumorales (Jean y cols, 1998).

2.18.2. Procedimiento

Para la realización de los western blots se lavó la monocapa celular con Krebs-Henseleit (a 4°C y pH 7,4). Se rompieron las membranas celulares mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en tampón de lisis (150mM NaCl, 1mM EDTA,

10mM Tris-HCl, 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 1µg/ml leupeptina, 1µg/ml aprotinina y 1µg/ml pepstatina, pH 7,4). 50 µg de proteína (determinados por el método de Lowry) se llevaron a ebullición en tampón Laemmli. Tras la electroforesis en SDS-PAGE las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-CREB y anti-fosfo-CREB (Ser 133) de ratón (Chemicon International Inc.). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP).

2.18.3. Cálculos

La membrana se reveló con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Cell Signaling Technology), que es una mezcla (1:1) que contienen respectivamente H₂O₂ y luminol (sustrato de la HRP). Brevemente, el luminol en presencia de H₂O₂, es transformado por la HRP a un dianión excitado el cual emite luz al volver al estado fundamental (Schneppenheim y cols., 1991), esta luz emitida es capturada por una cámara de quimioluminiscencia (Fujifilm NAS-1000).

2.19. Ensayo con esfingomielinasa

2.19.1 Fundamento

La esfingomielinasa neutra (N-SMasa) es un mediador de la muerte celular por apoptosis. En este ensayo se comprobó el incremento de la actividad de esta enzima en las células B16M-F10 durante la interacción con las células HSE y en presencia de *t*-PTER y/o QUER. Este procedimiento se llevó a cabo a partir de la modificación de una metodología previamente descrita (Takeda 1999).

2.19.2. Procedimiento

Las células del melanoma B16-F10 (5×10^6) se lavaron dos veces en hielo con una solución salina de tampón fosfato y se homogeneizó con 0,4M de tampón de lisis celular [10mM HEPES/KOH (pH 7,4), 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 5mM de ditioneitol, 1mM de fenimetilsulfonil fluoruro, 100 μ M de pepstatina, 0,15 U/ml de aprotinina y 50mg/ml de leupeptina] conteniendo 0,1% de Triton X-100.

El homogenado se pasó a través de una aguja de 25-gauge y se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min a 4° C. El sobrenadante fue utilizado como fuente de la enzima.

La mezcla para el ensayo de la N-SMasa magnesio-dependiente contiene 0,1 M de tris-HCl (pH 7,5), 5nM de [N-metil-¹⁴C]esfingomielina (actividad específica: 55 mCi /mM),

10mM de $MgCl_2$, 0.1 Triton X-100 y 200 μg de proteína, teniendo un volumen final de 0.2 ml.

Para el ensayo con N-SMasa magnesio-independiente se utilizó un cóctel de reacción sin $MgCl_2$.

La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30min. La reacción se detuvo y se añadió 1,25 ml de cloroformo-metanol (2:1).

Posteriormente, se añadió 0,25 ml de agua bidestilada a los tubos y éstos se agitaron y se centrifugaron a 1000 x g durante 6 min, quedando dos fases. La fase superior se llevó al vial de centelleo y se cuantificó con el contador de centelleo (Packard Tri-Carb 2700TR Varisette).

2.20. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de uno o varios factores o tests de la t en donde fue más apropiado (SPSS 9.0). La homogeneidad de las varianzas se analizó por el test de Levene. La hipótesis nula se aceptó para todos aquellos valores de los test en los que el valor F no era significativo con un p valor mayor de 0,05. Los datos para los cuales el valor F era significativo se analizaron con un test de Tukey con un p valor menor de 0,0

RESULTADOS

1. Niveles plasmáticos de *t*-PTER y QUER

Los estudios para determinar los niveles en plasma de *t*-PTER y QUER se realizaron tras su administración a ratones vía oral (v.o.) e intravenosa (i.v.).

Las concentraciones de cada polifenol en las muestras de plasma se determinaron mediante HPLC/MS-MS.

Las muestras se recogieron secuencialmente a diferentes tiempos tras su administración. A continuación, son referidas ambas líneas de trabajo.

1.1. Administración oral

Tras la administración v.o. de *t*-PTER y QUER, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 7.

Tabla 7: Concentraciones plasmáticas de t-PTER y QUER, tras su administración oral a una dosis de 20mg/kg de peso de ratón

Tiempo (min)	t-PTER (μ M)	QUER (μ M)
0	0	0
5	1,9 \pm 0,01	0,4 \pm 0,07
10	3,3 \pm 0,9	0,01 \pm 0,004
30	3,9 \pm 1,1	0,003 \pm 0,001
60	3,1 \pm 0,5	0,001 \pm 0,0005
120	2,0 \pm 0,5	0,0004 \pm 0,00005
240	1,7 \pm 0,2	0,0003 \pm 0,00001
480	1,0 \pm 0,1	0,0003 \pm 0,00001
720	0,2 \pm 0,06	n.d
1440	n.d	n.d

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm la desviación estándar para 6 ratones en cada tiempo y cada polifenol administrado; n.d.= no detectable

Como podemos observar en la tabla 7, las concentraciones plasmáticas máximas tras la administración v.o. de 20mg de t-PTER o QUER/kg de peso, fueron respectivamente, 3,9 μ M a los 30 minutos y 0,4 μ M a los 5 minutos tras su administración. A las 12 horas tras la administración la concentración

plasmática de *t*-PTER fue 0,2 μ M y la de QUER resultó inferior al límite de detección de esta técnica (0,1nM).

1.2. Administración intravenosa

Tras la administración i.v. de *t*-PTER y QUER, también a una dosis de 20 mg/kg de peso de ratón, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 8:

Tabla 8: Concentraciones plasmáticas de *t*-PTER y QUER, tras su administración i.v.

TIEMPO (min)	<i>t</i> -PTER (μ M)	QUER (μ M)
0	0	0
5	95 \pm 9	46 \pm 5
10	80 \pm 12	35 \pm 5
20	35 \pm 6	22 \pm 4
30	26 \pm 5	12 \pm 4
60	17 \pm 5	2 \pm 1
120	9 \pm 3	1 \pm 0,5
240	3 \pm 1	n.d
480	1 \pm 0,5	n.d

Los resultados se expresan como la media aritmética \pm la desviación estándar para 6 ratones en cada tiempo estudiado y por cada polifenol administrado vía i.v.; n.d.= no detectable

Como podemos observar en la tabla 8, tras la administración i.v. de 20mg de *t*-PTER o QUER/kg de peso, las concentraciones máximas obtenidas fueron de 95 μ M de *t*-PTER y 46 μ M de QUER a los 5 minutos. Estas concentraciones disminuyeron a valores \leq 1 μ M pasadas 8 horas, en el caso del *t*-PTER, y pasadas 2 horas en el caso de QUER.

Con los datos presentados en la tabla 8, se pudo calcular, la concentración plasmática media durante la primera hora tras la administración i.v. de 20 mg de cada polifenol/kg de peso. En el caso de *t*-PTER fue \sim 40 μ M y en el caso de QUER fue \sim 20 μ M.

Dichas concentraciones se utilizaron en los estudios *in vitro* de la presente tesis. Estas concentraciones fueron aplicadas solamente durante una hora cada día.

2. Niveles extravasculares de *t*-PTER y QUER

Con el fin de complementar los datos farmacocinéticos obtenidos de *t*-PTER y QUER, se determinaron los niveles de ambos polifenoles en el hígado, riñón, pulmón y cerebro, a los 5, 10, 30 y 60 minutos después de la administración i.v. de 20

mg de cada polifenol/kg de peso, obteniéndose los resultados expuestos en la tabla 9:

Tabla 9: Concentraciones de t-PTER y QUER en distintos tejidos, tras su administración i.v.

Tiempo (min)	Cerebro		Pulmón		Hígado		Riñón	
	t-PTER	QUER	t-PTER	QUER	t-PTER	QUER	t-PTER	QUER
(nmol/g de tejido)								
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5±1	4±1	36±6	15±3	14±4	9±3	3±1	1±0,2
10	2±0,5	2±0,4	15±3	8±2	7±1	3±1	3±0,3	1±0,5
30	n.d.	n.d.	6±1	2±0,6	3±0,5	1±0,2	2±0,4	n.d.
60	n.d.	n.d.	2±1	n.d.	n.d.	n.d.	1±0,3	n.d.

Los resultados se expresan como la media aritmética ± la desviación estándar para 6 ratones en cada tiempo estudiado y por cada polifenol administrado vía i.v.; n.d.= no detectables.

En la tabla 9, se observa que en el cerebro los niveles de t-PTER y QUER fueron 5nmol/g de tejido y 4nmol/g de tejido, respectivamente, a los 5 minutos tras la administración i.v. de 20 mg de cada uno/kg de peso. A partir de los 5 minutos las concentraciones detectadas fueron más bajas, de manera que después de 10 minutos tras su administración, se eliminó más

de la mitad de *t*-PTER y la mitad de QUER presente. A los 30 y a los 60 minutos los niveles de *t*-PTER y QUER fueron indetectables.

El pulmón es el tejido donde se detectaron los niveles más altos de *t*-PTER y QUER. La concentración máxima en este tejido, se detectó a los 5 minutos tras la administración de 20 mg de cada polifenol/kg de peso y ésta fue 36 y 15nmol/g de tejido de *t*-PTER y QUER, respectivamente. Estos niveles descendieron a la mitad pasados 10 minutos. A los 60 minutos sólo se detectó *t*-PTER a una concentración de 2nmol/g de tejido.

En el hígado, a los 5 minutos tras la administración i.v. de 20 mg de cada polifenol/kg de peso, se detectaron 14 y 9nmol/g de tejido de *t*-PTER y QUER, respectivamente. Pasados 10 minutos dichos niveles se redujeron hasta la mitad. A los 30 minutos, los niveles detectados fueron de 3 y 1nmol/g de tejido de *t*-PTER y QUER, respectivamente.

En el riñón fue donde se detectaron los niveles más bajos de *t*-PTER y QUER. A los 5 minutos tras la administración i.v. de 20mg de cada polifenol/kg de peso, las concentraciones detectadas fueron 3 y 1nmol/g de tejido de *t*-PTER y QUER, respectivamente. A los 60 minutos sólo se detectó *t*-PTER, cuya concentración fue 1nmol/g de tejido.

3. Efecto de *t*-PTER y QUER sobre el crecimiento *in vitro* de las células B16M-F10

Se estudió el efecto de *t*-PTER y QUER sobre el crecimiento *in vitro* de las células B16M-F10 y los resultados que se obtuvieron, se muestran en la tabla 10.

Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron las concentraciones medias que resultaron de las obtenidas durante la primera hora tras la administración i.v. de 20 mg de cada polifenol/kg de peso. Éstas fueron 40 μ M de *t*-PTER y 20 μ M de QUER y se aplicaron sobre las células B16M-F10 durante solamente una hora cada día. Estos polifenoles se añadieron a las 6, 30 y 54 horas de cultivo de las células tumorales. Transcurridas 72 horas, se determinó el efecto de los polifenoles sobre el crecimiento *in vitro* de las células B16M-F10 (véase también figura 20a, apartado 4).

Además, con el fin de comparar el efecto del resveratrol (RESV) con el efecto de *t*-PTER y QUER, se hicieron estudios utilizando *t*-RESV sobre el crecimiento *in vitro* de las células B16M-F10.

El *t*-RESV fue aplicado a la concentración de 12 μ M, que era la concentración media de las que se obtuvieron durante la primera hora tras la administración i.v. de 20 mg de *t*-RESV/kg de peso (Asensi y cols, 2002).

Tabla 10: N° de células de melanoma B16M-F10 tras 72 horas de cultivo en presencia de *t*-RESV y/o *t*-PTER y/o QUER durante 1 hora/día

CRECIMIENTO TUMORAL (n° células x 10 ⁶)	
	A las 72h de cultivo
CONTROL	1,020 ± 0,09
<i>t</i>-RESV	1,015 ± 0,07
<i>t</i>-PTER	0,610 ± 0,05**
QUER	0,830 ± 0,07*
<i>t</i>-RESV + QUER	0,578 ± 0,06**
<i>t</i>-RESV + <i>t</i>-PTER	0,778 ± 0,05**
<i>t</i>-PTER + QUER	0,450 ± 0,04**

*Los resultados se expresan como la media aritmética ± la desviación estándar entre los valores obtenidos de cada experimento. La significación estadística se determinó mediante el test de la *t* de Student y se expresa como sigue: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando cada condición con el control.*

Como podemos observar en la tabla 10, exposiciones a una concentración de *t*-RESV, durante una hora al día, no produjo efectos significativos sobre el crecimiento de las células B16M-F10. Sin embargo, el derivado dimetoxilado del *t*-RESV, el *t*-PTER, aplicado durante una hora al día y a una concentración de 40µM, inhibió un 40% el crecimiento *in vitro* de las células

B16M-F10. También observamos que cuando se aplica QUER (20µM, 1h/día) se inhibe un 19% el crecimiento *in vitro* de las células B16M-F10.

Por otra parte, ni la asociación de *t*-RESV y *t*-PTER, ni la asociación de *t*-RESV y QUER, a concentraciones biodisponibles, produjeron efectos aparentes sobre la proliferación *in vitro* de las células B16M-F10 con respecto a los polifenoles no asociados (~ 40% *t*-PTER vs ~ 43% *t*-PTER+ *t*-RESV, ~ 19% QUER vs ~ 24% QUER+ *t*-RESV). Sin embargo, la asociación *t*-PTER y QUER es la condición que induce mayor inhibición del crecimiento de las células (~ 56%).

4. Interacción *in vitro* entre las células B16M-F10 con el HSE

Se estudió el efecto de *t*-PTER, QUER y *t*-RESV sobre la interacción *in vitro* entre las células B16M-F10 y el HSE. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 11.

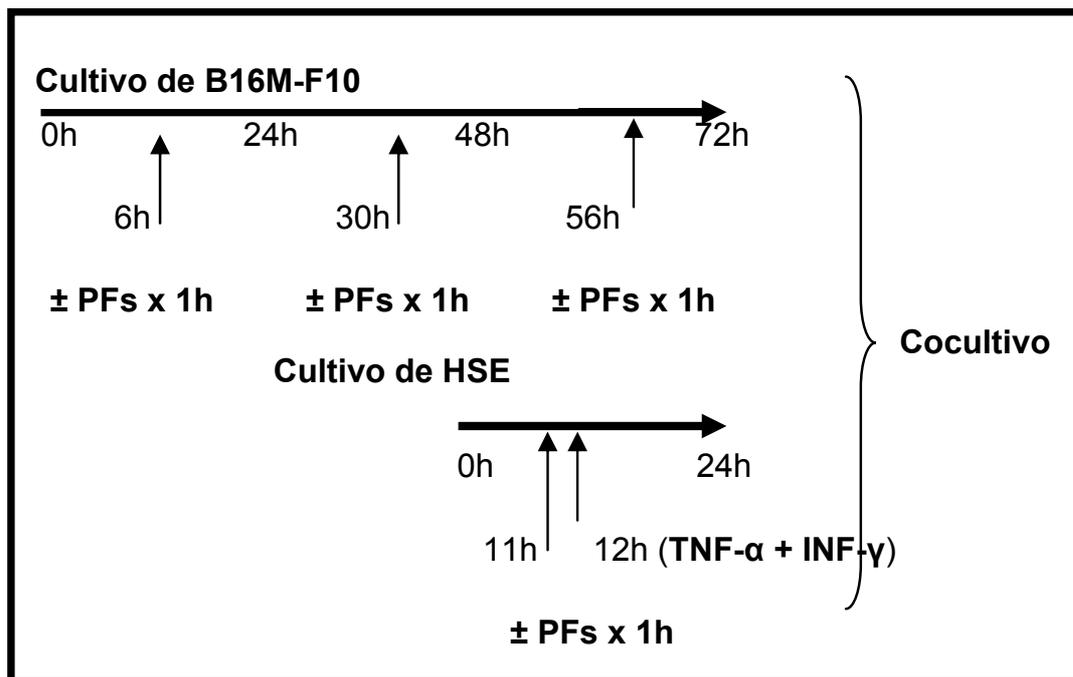
Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron 40µM de *t*-PTER, 20µM de QUER y 12µM de *t*-RESV, concentraciones que representan aproximadamente la media de las obtenidas durante la primera hora, tras la administración i.v. de 20mg de cada polifenol/kg de peso.

Para determinar el grado de adhesión entre las células B16M-F10 y las células del HSE, se les aplicó a estas últimas, 40 μ M de *t*-PTER y/o 20 μ M de QUER y/o 12 μ M de *t*-RESV durante una hora. Estas células endoteliales estaban adheridas a una matriz de colágeno y tras 12 horas de la aplicación de los polifenoles (véase figura 21), se cocultivaron durante 20 minutos con las células B16M-F10 (véase figura 21). Estas células habían sido pretratadas con polifenoles (una hora cada día en su medio de cultivo; en concreto, se añadieron a las 6, 30 y 54 horas de cultivo) (véase figura 21).

Se estudió también la citotoxicidad inducida por las células del HSE sobre las células tumorales adheridas (expresada como el porcentaje de células tumorales adheridas que pierden su viabilidad). Para ello, el cocultivo se mantuvo durante 6 horas y tras este tiempo y se midió la fluorescencia que emitían las células tumorales, que se habían marcado con Calceína-AM (véase apartado 2.6 de Materiales y Métodos) (véase figura 21).

Se realizaron ensayos de invasión *in vitro*, determinándose después de 5 días de cocultivo, el número de colonias tumorales formadas gracias al paso de células tumorales a través de la monocapa endotelial (véase apartado 2.7 de materiales y métodos) (véase figura 21). Los resultados se muestran en la tabla 11.

Figura 21: Protocolo y pretratamiento para el cocultivo



Esquema-resumen del procedimiento que se sigue para el tratamiento previo y cocultivo de células B16M-F10 y HSE en el ensayo de adhesión y citotoxicidad entre ambos tipos celulares.

Tabla 11: Porcentaje de células B16M-F10 adheridas al HSE, porcentaje de citotoxicidad de las células B16M-F10 adheridas y nº de colonias formadas en presencia de t-RESV y/o t-PTER y/o QUER *in vitro*

	Células tumorales		
	Adhesión (%)	Citotoxicidad (% células adheridas)	Formación Colonias Nº / cm ²
Control	100 ± 15	15 ± 2	157 ± 17
t-RESV	53 ± 7**	12 ± 3	104 ± 12**
t-PTER	40 ± 6**	19 ± 3*	89 ± 9**
QUER	98 ± 11	52 ± 6**	106 ± 15**
t-RESV+t-PTER	32 ± 4**	17 ± 4	77 ± 8**
t-RESV+QUER	55 ± 7**	55 ± 7**	70 ± 7**
t-PTER+QUER	37 ± 5**	54 ± 5**	41 ± 5**

Cada dato expuesto en la tabla representa la media aritmética \pm la desviación estándar de 6 experimentos distintos en cada caso. La significación estadística se determinó mediante el test de la *t* de Student y se expresa como sigue: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando cada condición con el control.

En la tabla 11 se observa que sobre la adhesión actúan el t-RESV y el t-PTER de tal modo que, con el t-RESV el

porcentaje de las células B16M-F10 adheridas al endotelio se redujo un $\sim 47\%$ y con su análogo, el *t*-PTER, se redujo en un $\sim 60\%$. El *t*-RESV junto con *t*-PTER redujo la adhesión en un $\sim 68\%$.

En el caso de la aplicación de *t*-RESV junto con QUER la adhesión se redujo un $\sim 45\%$, y un $\sim 63\%$ en el caso de la aplicación de *t*-PTER junto QUER (resultados similares a los que se obtienen con *t*-RESV y *t*-PTER aplicados por separado sin QUER).

En la tabla 11 se observan, además, los datos en referencia a la citotoxicidad causada por cada polifenol, y la asociación entre ellos, sobre las células B16M-F10 adheridas al HSE. En este caso, el polifenol que más citotoxicidad tumoral indujo fue la QUER ($\sim 55\%$). El *t*-RESV no produjo efecto citotóxico, sin embargo su análogo estructural, el *t*-PTER indujo una citotoxicidad de \sim un 19% .

La asociación de *t*-RESV y QUER produjo una citotoxicidad del $\sim 52\%$, la asociación de QUER y *t*-PTER produjeron una citotoxicidad del $\sim 54\%$. Estos resultados fueron muy similares a los que se obtuvieron cuando se aplicó QUER por separado ($\sim 55\%$).

Finalmente en la tabla 11, se presenta el número de colonias formadas. En el caso del *t*-RESV se redujeron \sim un 40% las

colonias. Cuando se aplicó *t*-PTER, redujeron ~ un 49% y con QUER ~ un 44%.

Cuando se utilizaron asociaciones de polifenoles se vieron los siguientes resultados. Con *t*-RESV y *t*-PTER se redujeron las colonias metastatizadas en un 56% y *t*-RESV y QUER las redujeron un 60%, y *t*-PTER y QUER y ~ un 74%.

5. Expresión de las moléculas de adhesión intercelular

Se estudió el efecto de los polifenoles sobre la expresión de VLA-4 y de VCAM-1 en células B16M-F10 y HSE, respectivamente. Los datos que se obtuvieron se muestran en la tabla 12.

Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron las mismas utilizadas en el apartado anterior.

Para este ensayo se realizó un cocultivo de las células B16M-F10 con las células del HSE (véase figura 20, apartado 4). Tras 20 minutos de cocultivo ambos tipos celulares se separan y se incuban las células del HSE con anti-VCAM-1 y las células B16M-F10 con anti-VLA-4, ambos marcados con fluoresceína (véase apartado 2.8 en Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Efecto de t-PTER y/o QUER sobre la expresión de VLA-4 en las B16M-F10 y de VCAM-1 en las células de HSE *in vitro*

	Δ FL1			
	Control	t-PTER	QUER	P+Q
B16M-F10	12 ± 3	16 ± 3	10 ± 2	14 ± 3
B16M-F10 +Anti- VLA-4	159 ± 27	168 ± 31	144 ± 32	150 ± 21
HSE	36 ± 6	25 ± 6	30 ± 5	28 ± 4
HSE + Anti- VCAM-1	266 ± 44	107 ± 19**	242 ± 53	116 ± 17**

Los datos representan la variación en la intensidad de fluorescencia (Δ FL1) y se expresan como el promedio de los valores obtenidos \pm desviación estándar de 4-5 experimentos diferentes, en cada caso. La significación estadística se determinó mediante el test de la t de Student y se expresa como sigue: ** $p < 0,01$ por comparación de las incubaciones con polifenol(es) y en ausencia de ellos.

Como se muestra en la tabla 12, la aplicación de t-PTER hizo que la expresión de VCAM-1 en las células HSE disminuyera ~ un 40%, con respecto a la expresión de ésta en ausencia de polifenoles. Sin embargo, la expresión de VCAM-1 no se vio afectada con QUER. La asociación de ambos polifenoles consiguió un descenso en la expresión de VCAM-1 similar al

que se obtuvo con t-PTER. En cuanto a la expresión de VLA-4 en las células B16M-F10, no se encontraron diferencias significativas entre controles e incubaciones en presencia de polifenoles (véase tabla 12).

6. Expresión de los genes pro- y antiapoptóticos en las células B16M-F10

Se estudió la influencia de t-PTER y QUER sobre expresión de distintos genes de la familia Bcl-2, proapoptóticos y antiapoptóticos, en las células B16M-F10. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Efecto de t-PTER y/o QUER sobre la expresión de genes proapoptóticos o antiapoptóticos en células B16M-F10 *in vitro*

GEN	ADICIONES			
	NINGUNA	t-PTER	QUER	t-PTER + QUER
Bax	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,3**	2,5 ± 0,3**	2,5 ± 0,5**
Bak	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2*	1,3 ± 0,2
Bad	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,3**	2,2 ± 0,3**
Bid	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1**	1,5 ± 0,1**
Bcl-2	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1**	0,15 ± 0,05**	0,15 ± 0,05**
Bcl-w	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1*	0,8 ± 0,2**	0,8 ± 0,2**
Bcl-xl	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1**	0,7 ± 0,2**

Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). Los valores representan el “fold change” y se expresan como el promedio de los valores obtenidos \pm desviación estándar de 4-5 experimentos diferentes, en cada caso. Se compararon los valores obtenidos con *t*-PTER y/o QUER y los valores control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Los cálculos estadísticos se realizaron con el test de la *t* de Student.

Como se muestra en la tabla 13, el *t*-PTER aumentó el doble la expresión del gen proapoptótico *bax* con respecto a la expresión de este gen en el control y redujo, además, la expresión del gen antiapoptótico *bcl-2* en ~ un 54% y del gen *bcl-w* en ~ un 25%.

Con QUER, obtuvimos resultados a destacar ya que aumentó la expresión de todos los genes proapoptóticos. Aumentó más del doble la expresión de los genes *bax* y *bak* y aumentó ~ un 30%, la expresión de los genes *bad* y *bid*. Además hizo disminuir la expresión de todos los genes antiapoptóticos analizados; aproximadamente un 87% la expresión de *bcl-2*, un 33% la expresión del gen *bcl-w* y un 50% la del gen *bcl-xl*. La asociación de ambos polifenoles, no modificó significativamente el efecto logrado por la QUER.

7. Metástasis hepática *in vivo*

Se estudió el efecto *in vivo* de *t*-PTER y QUER sobre las metástasis hepáticas del B16M-F10, y los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Metástasis hepática de células B16M-F10 normales y células B16M-F10/tet-Bcl-2 pretratadas con *t*-PTER y QUER

	ADICIONES	MELANOMA	
		B16M-F10	B16M-F10/tet-Bcl-2
Bcl-2 intracel. (U/mg proteína)	NINGUNA	35 ± 5	160 ± 25 ⁺⁺
	<i>t</i>-PTER	21 ± 4 ^{**}	151 ± 18 ⁺⁺
	QUER	9 ± 3 ^{**}	125 ± 13 ⁺⁺⁺
	<i>t</i>-PTER+QUER	7 ± 2 ^{**}	118 ± 16 ^{**++}
Células retenidas en hígado (Promedio/lóbulo hepático)	NINGUNA	45 ± 7	42 ± 6
	<i>t</i>-PTER	20 ± 5 ^{**}	21 ± 4 ^{**}
	QUER	46 ± 9	40 ± 7
	<i>t</i>-PTER+QUER	18 ± 4 ^{**}	17 ± 3 ^{**}
Células tumorales intactas (% células en hígado)	NINGUNA	83 ± 14	85 ± 13
	<i>t</i>-PTER	20 ± 5 ^{**}	91 ± 20
	QUER	52 ± 8 ^{**}	87 ± 13 ⁺⁺
	<i>t</i>-PTER+QUER	48 ± 10 ^{**}	90 ± 17 ⁺⁺

Densidad metastásica (N° focos/100m m ³)	NINGUNA	27 ± 5	29 ± 5
	t-PTER	18 ± 4**	15 ± 3**
	QUER	15 ± 4**	26 ± 5 ⁺⁺
	t-PTER+QUER	7 ± 2**	20 ± 4 ⁺⁺⁺
Vol. metastásico (% volumen de hígado)	NINGUNA	22 ± 4	25 ± 6
	t-PTER	14 ± 4**	15 ± 3**
	QUER	12 ± 3**	26 ± 5 ⁺⁺
	t-PTER+QUER	6 ± 2**	19 ± 5 ⁺⁺
Supervivencia (días)	NINGUNA	13 ± 2	12 ± 1
	t-PTER	15 ± 2	12 ± 2
	QUER	15 ± 1	13 ± 2
	t-PTER+QUER	27 ± 3**	14 ± 2 ⁺⁺

Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). con células B16M-F10 normales y células B16M-F10/Tet-Bcl-2 (con el gen bcl-2 sobreexpresado). Los dos tipos de células tumorales se inocularon vía porta.

Las células retenidas en el hígado, se calcularon 60 minutos después de la inoculación de éstas en el ratón. El número de células dañadas, se midió 6 horas después de la inoculación. El crecimiento metastásico se estudió a los 10 días después tratar a los animales cada día vía i.v., con 20 mg de t-PTER y/o QUER/ kg de peso.

Finalmente, el estudio de los días de supervivencia de los animales, se realizó administrando cada día vía i.v. 20mg de t-PTER y/o QUER/ kg de ratón.

Se emplearon grupos de animales control, a los que se les inocularon células tumorales que no habían sido expuestas a los polifenoles.

Los datos obtenidos en referencia a células retenidas y células intactas se expresan como el promedio de los datos obtenidos \pm desviación estándar para 5 experimentos realizados. El crecimiento metastásico en el hígado y los días de supervivencia se expresan como el promedio de los datos obtenidos \pm desviación estándar de 25 ratones por grupo experimental.

En todos los estudios, se comparó PTER \pm QUER vs controles ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$), y B16M-F10/Tet-Bcl-2 vs B16M-F10 ($^{\dagger}p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$). Los cálculos estadísticos se realizaron con el test de la *t* de Student.*

Como se puede observar en la tabla 14, el pretratamiento de ambos tipos de células tumorales con t-PTER y QUER *in vitro*, antes de la inoculación, redujo los niveles intracelulares de Bcl-2. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en las tablas 14 y 13 (apartado 6), podemos afirmar que éste efecto fue debido principalmente a la QUER.

Además el t-PTER y la asociación de t-PTER y QUER, disminuyeron de igual manera, el número de células tumorales B16M-F10 y B16M-F10/tet-Bcl-2 retenidas en el lóbulo hepático.

El bajo nivel de Bcl-2 que presentan las células B16M-F10, hace que éstas sean susceptibles al efecto de la QUER. Sólo en este caso, se produjo un descenso en el número de células no dañadas ya que en el caso de las células B16M-F10/tet-Bcl-2 estuvieron protegidas por sus elevados niveles de Bcl-2.

El efecto de la administración de los *t*-PTER y/o QUER vía i.v., durante 10 días, a los animales inoculados con los dos tipos de células tumorales, influyó en mayor medida sobre el crecimiento metastásico cuando se inocularon células B16M-F10. En este caso, la densidad y el volumen metastásico se redujo ~ un 74%. El *t*-PTER y QUER demostraron tener un efecto antimetastásico similar (disminuyendo ~ un 34% y un 45% la densidad y volumen metastásicos, respectivamente).

Además, en el estudio de los días de supervivencia de los animales tratados cada día vía i.v. con 20 mg de polifenoles/kg de ratón, se comprobó que vivieron durante más días al tratarse de células B16M-F10 control. En este caso el tratamiento con polifenoles prácticamente duplicó la supervivencia de los animales portadores de B16M-F10.

8. Efecto de *t*-PTER y QUER sobre la producción de NO y H₂O₂ por las células B16M-F10

Se estudió el efecto sobre la producción de NO y H₂O₂ por parte de células B16M-F10, en presencia de *t*-PTER y QUER y los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 15.

Tabla 15: Efecto de *t*-PTER y/o QUER sobre la generación de NO y H₂O₂ por células B16M-F10

	NO _x	H ₂ O ₂
Adiciones	(nmol/10 ⁶ células)	
Medio basal	0,43 ± 0,08	12,6 ± 2,9
<i>t</i> -PTER	0,27 ± 0,06**	10,5 ± 1,6
QUER	0,15 ± 0,04**	9,4 ± 1,7
<i>t</i> -PTER+QUER	0,05 ± 0,02**	8,3 ± 1,4*

Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). Las células tumorales se cultivaron como indica en la figura 20a del apartado 4. Los datos que se obtuvieron corresponden al total de nitrito más los nitratos (NO_x) y H₂O₂ que se acumuló durante un periodo de 3 horas, 12 horas después de eliminar los polifenoles.

Los valores representan la media aritmética ± desviación estándar de 5 experimentos distintos. La significación estadística se determinó mediante el test de la *t* de Student y se expresa como sigue: **p*<0,05; ***p*<0,01

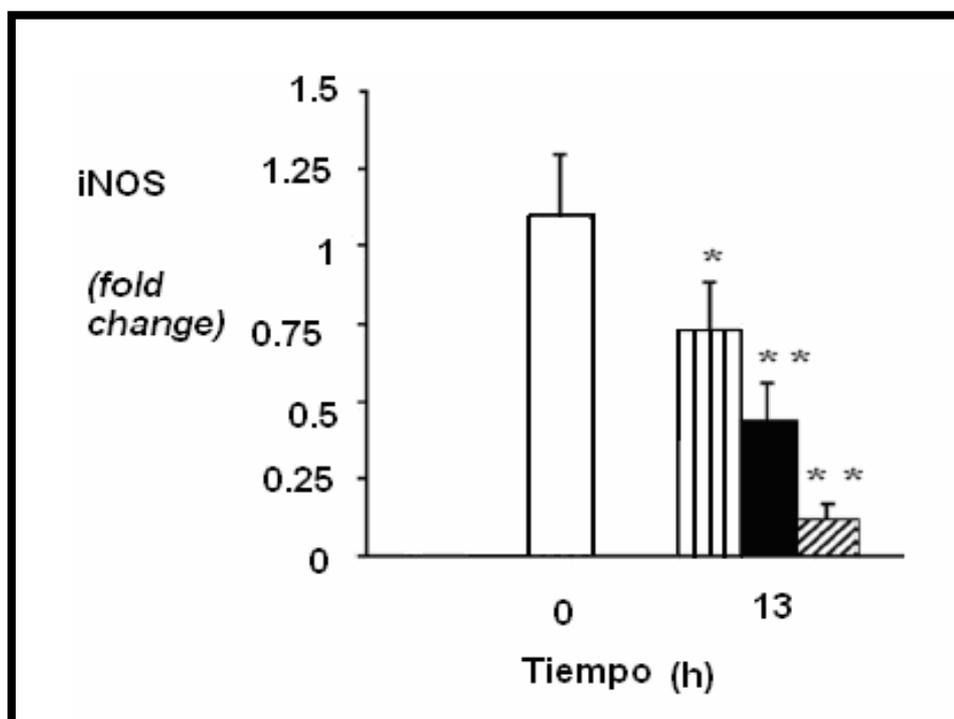
comparando cada valor con los controles ("Medio basal" sin polifenoles añadidos). Durante el periodo de incubación las células B16M-F10 mantuvieron una viabilidad >95%.

Como se muestra en la tabla 15, *t*-PTER o QUER disminuyen la generación de NO por parte de las células B16M-F10, logrando un efecto sinérgico cuando ambos estuvieron presentes (llegando en este caso a reducir la producción de NO en ~ un 90%). En cuanto a la producción de H₂O₂, sólo se vio afectada, cuando ambos polifenoles estuvieron presentes (en este caso disminuyó ~ un 35%).

El NO endógeno, puede producirse por la actividad de otras NOS (eNOS, mNOS y nNOS) diferentes a la iNOS (Salvucci y cols., 2001; Haynes y cols., 2004). Sin embargo, el efecto de *t*-PTER y QUER sobre la producción de NO por las células B16M-F10 (tabla 15) fue similar al obtenido cuando se trató a éstas, durante 12 horas, con un inhibidor de iNOS (2mM de aminoguanidina, AMG). Así que se puede deducir que la NOS diana de estos polifenoles es fundamentalmente la iNOS.

A la vista de estos resultados, en un siguiente paso, estudiamos el efecto *t*-PTER y/o QUER, sobre la expresión de iNOS. Ello se llevó a cabo mediante RT-PCR y los datos que se obtuvieron se representan mediante un diagrama de barras en la figura 22.

Figura 22: Expresión del gen iNOS en B16M-F10 tratadas *in vitro* con *t*-PTER y/o QUER



Los barras representan los datos obtenidos que equivalen a la media aritmética del fold change \pm la desviación estándar de 5 experimentos realizados.

La barra blanca a tiempo 0 corresponde a la expresión de iNOS antes del ensayo con los polifenoles. La barra con rayas verticales corresponde a la aplicación de 40 μ M de *t*-PTER; la barra negra corresponde a 20 μ M QUER; y la barra con rayas oblicuas corresponde a *t*-PTER+QUER;

La significación estadística se determinó mediante el test de la *t* de Student y se expresa como sigue: * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparando los resultados a tiempo 0 y a tiempo 13.

Los datos obtenidos reflejaron que con *t*-PTER la expresión se redujo ~ un 25%. Con QUER, el efecto fue mayor siendo la expresión de iNOS ~ un 70% menor. Y por último, el efecto más destacado se logró con la asociación de ambos que indujeron una disminución de ~ un 90%.

9. Efecto de *t*-PTER y QUER sobre la generación de NO y H₂O₂ durante la adhesión de las células B16M-F10 al HSE

Se estudió el efecto de *t*-PTER y QUER sobre la generación de NO y H₂O₂ durante la interacción de células B16M-F10 con células HSE. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 16.

Tabla 16: Efecto de la aplicación de *t*-PTER y/o QUER sobre la generación de NO_x y H₂O₂ durante la interacción de las células B16M-F10 con el HSE

Adiciones	NO _x		H ₂ O ₂	
	(nmol/10 ⁶ células)	%HSE	(nmol/10 ⁶ células)	%HSE
Medio basal	2,5 ± 0,6	90 ± 8	38 ± 7	66 ± 12
<i>t</i> -PTER	3,7 ± 0,8	86 ± 11	45 ± 8	70 ± 10
QUER	5,0 ± 1,0**	89 ± 14	41 ± 7	73 ± 11
<i>t</i> -PTER+QUER	7,2 ± 1,2**	84 ± 10	42 ± 10	69 ± 13

*Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). El medio de cultivo se analizó pasadas 3 horas del cocultivo y se determinó tanto el NO_x como H₂O₂ (véase apartado 2.13 en Materiales y Métodos). Los valores representan la media aritmética ± desviación estándar de los 6 experimentos realizados. La significación estadística se determinó mediante el test de la t de Student y se expresa como sigue: **p<0,01 comparando cada valor con el control. (El “Medio basal” sin polifenoles adicionados). Durante el tiempo de incubación las células tanto las del endotelio como las tumorales mantuvieron una viabilidad >95%.*

La tabla 16 muestra que durante el proceso de adhesión *in vitro* de las células B16M-F10 al endotelio, la QUER y la asociación de t-PTER y QUER, incrementaron en gran medida la liberación de NO al medio extracelular y sin embargo, cuando se analizaron los niveles de H₂O₂, no se observó ninguna diferencia significativa con respecto del medio basal. Este hecho es importante, ya que un aumento de los niveles de NO en el microambiente de la célula tumoral supone un riesgo para la viabilidad de ésta (Carretero y cols., 2001).

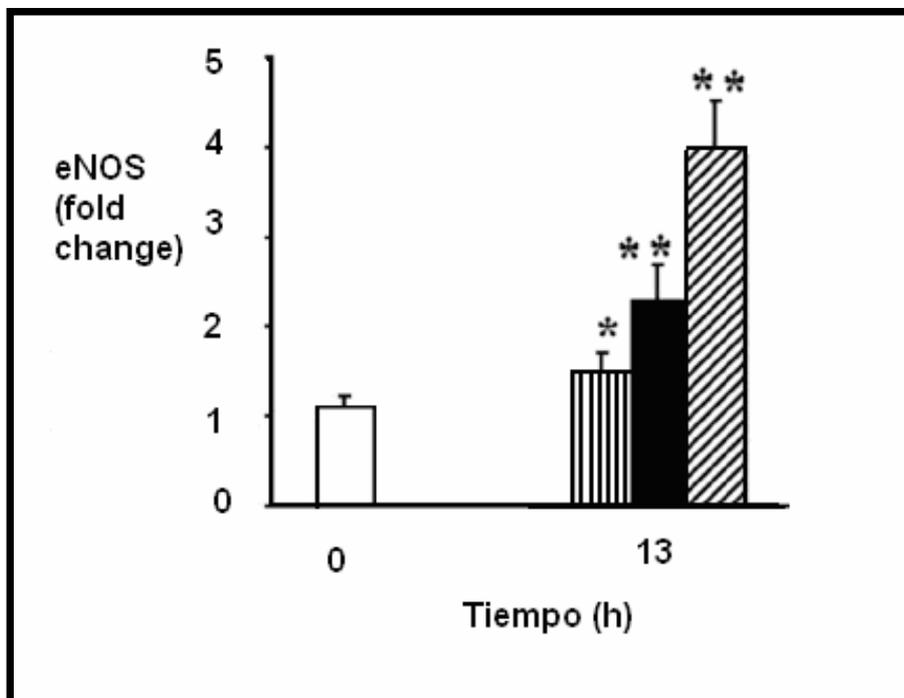
Además en la tabla 16, se muestra el porcentaje de NO que procede de las células del HSE durante el proceso de adhesión. Para ello, en un experimento paralelo, se utilizaron células del HSE precultivadas durante 12h en presencia de 1mM N-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster), que bloqueaba la síntesis de NO (Rees y cols, 1990) sin alterar la adhesión. De

este modo, el NO presente procedía sólo de las células B16M-F10 y la diferencia resultante correspondería al NO producido por las células del HSE. Además, otro método que se realizó para este fin, fue el de restar al NO presente en el medio del cocultivo, el NO generado cuando las células tumorales se habían cultivado sin células endoteliales. Este último procedimiento se utilizó también, para determinar el porcentaje de H₂O₂ producido a partir de las células de HSE.

Podemos afirmar así (véase tabla 16), que la mayor parte del NO y H₂O₂ generado durante la adhesión, procede de las células del HSE.

Con estos resultados se estudió si *t*-PTER y/o QUER influían sobre la expresión de eNOS en las células del HSE. Los datos que se obtuvieron por RT-PCR se representan mediante un diagrama de barras en la figura 23.

Figura 23: Expresión del gen eNOS en células del HSE tratadas *in vitro* con t-PTER y/o QUER



Los barras representan los datos obtenidos equivalentes a la media aritmética del fold change \pm la desviación estándar de 5 experimentos diferentes realizados.

La barra blanca a tiempo 0 corresponde a la expresión de eNOS antes del ensayo con los polifenoles. La barra a rayas verticales corresponde a la incubación con 40 μ M de t-PTER; la barra negra a la incubación con 20 μ M de QUER; y la barra con rayas oblicuas corresponde a t-PTER+QUER;

La significación estadística se determinó mediante el test de la t de Student y se expresa como sigue: * p <0,05 y ** p <0,01, comparando los resultados a tiempo 0 y a tiempo 13.

La QUER duplicó aproximadamente la expresión de eNOS. El *t*-PTER, aumentó ~ un 25% la expresión. Y la asociación de *t*-PTER y QUER prácticamente la triplicó.

10. Interacción *in vitro* entre las células B16M-F10 con el HSE eNOS (+/+) y eNOS (-/-)

Se estudió el efecto de *t*-PTER, QUER y *t*-RESV sobre la interacción *in vitro* entre las células B16M-F10 y dos tipos de células del HSE. Se estudió el efecto de estos polifenoles sobre la adhesión, viabilidad y crecimiento invasivo de las células B16M-F10 en su interacción con dos tipos de células HSE. Los resultados que se obtuvieron, se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Efecto de *t*-PTER y QUER durante la interacción *in vitro* con células del HSE eNOS (+/+) y eNOS (-/-)

	Adiciones	eNOS (+/+)	eNOS (-/-)
Adhesión tumoral (%)	----	65±12	61±11
	P+Q	31±7*	34±5*
NO _x (nmol/10 ⁶ células)	----	2,2±0,4	0,2±0,1 ⁺
	P+Q	7,7±1,0*	0,4±0,1 ⁺
H ₂ O ₂ (nmol/10 ⁶ células)	----	36±5	35±6
	P+Q	42±7	39±6

Citotoxicidad B16M-F10 (%)	----	10±3	1±0,5 ⁺
	P+Q	56±8*	3±1 ⁺
Células apoptóticas (%)	----	5±2	1±0,5 ⁺
	P+Q	42±7*	1±0,5 ⁺
Nº de colonias debajo del endotelio/cm²	----	77±9	152±16 ⁺
	P+Q	13±5*	132±17 ⁺

*Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). Se utilizaron células del HSE eNOS (+/+), es decir, que expresa el gen eNOS y células HSE eNOS (-/-), es decir, con el gen eNOS deficiente. Los valores representan el promedio de los resultados obtenidos ± desviación estándar para 5-6 experimentos diferentes, en cada caso. La significación estadística se determinó mediante el test de la t de Student y se expresa como sigue: * $p < 0,01$ comparado t-PTER y QUER con los casos sin adiciones, ⁺ $p < 0,01$ comparando eNOS (-/-) frente a eNOS (+/+).*

Como se puede observar en la tabla 17, el % de adhesión de las células B16M-F10 al endotelio disminuye en presencia de ambos polifenoles. Un hecho en concordancia con los datos que se obtuvieron anteriormente, donde se demostraba que el t-PTER disminuía la expresión de VCAM-1 en el endotelio (véase tabla 12 apartado 5).

En el caso de células eNOS (-/-), los niveles detectados de NO fueron muy bajos, tanto con polifenoles como sin ellos. Lo cual indica que el aumento de NO inducido por los polifenoles tiene lugar vía eNOS.

T-PTER y QUER, indujeron un aumento del porcentaje de muerte de células B16M-F10 (principalmente por apoptosis) durante la adhesión con las células endoteliales. Este efecto fue dependiente del NO.

La producción de H₂O₂ en ninguno de los casos se vio afectada.

La asociación de ambos polifenoles aumentó la citotoxicidad y el porcentaje de apoptosis de las células tumorales cuando se trataba de células eNOS (+/+). Estos valores fueron muy bajos cuando se trataba con células HSE eNOS (-/-).

Además, en el ensayo de invasión *in vitro*, se observó que al aplicar ambos polifenoles, se produjo un marcado descenso (~83%) en el número de colonias subendoteliales. Este hecho ocurrió con células eNOS (+/+), sin embargo con células eNOS (-/-) el descenso no fué significativo.

Para saber si el efecto citotóxico que sufren las células tumorales era mediado por el NO, se añadió al cocultivo, una sal potásica captadora de moléculas de NO (sal potásica del óxido de 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxilo a una concentración de 300mM). En estas condiciones se

observó que, tanto con polifenoles como sin ellos, la citotoxicidad tumoral era muy baja.

11. Regulación de la expresión de *bcl-2* por el NO en células B16M-F10

Se estudió la influencia del NO sobre la expresión del gen *bcl-2* en células B16M-F10. Los datos que se obtuvieron se muestran en la tabla 18. Manipulamos los niveles de NO generados por las células B16M-F10 mediante un inhibidor específico de iNOS, el AMG que reduce la generación de NO_x; y por otro lado, con el dador de NO, SNAP (S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina) que aumenta los niveles de NO.

Tabla 18: Efecto de NO sobre la expresión de *bcl-2* y los niveles de Bcl-2 en células B16M-F10

Adiciones	NO _x (nmol/ 10 ⁶ células)	<i>Bcl-2</i> (<i>fold</i> <i>change</i>)	Bcl-2 (unidades/mg proteína)
Medio basal	0,39±0,07	1,1±0,2	32±6
AMG(2mM)	0,05±0,02*	0,1±0,03*	4±1*
SNAP(0.3mM)	0,62±0,12*	0,9±0,2	30±5
SNAP(3mM)	7,15±0,26	0,2±0,07*	7±2*

RESULTADOS

AMG(2mM)+ SNAP(0.3mM)	0,33±0,08	1,0±0,2	30±7
AMG(2mM)+ SNAP(3.0mM)	6,08±0,17*	0,3±0,09*	9±3*
t-PTER(40 µM)+QUER(20µM)	0,04±0,01*	0,05±0,02*	5±1*
t-PTER(40 µM)+QUER(20µM) + SNAP(0.3mM)	0,36±0,07	1,0±0,1	35±4
t-PTER(40 µM)+QUER(20µM) + SNAP(3mM)	6,44±0,23*	0,3±0,05*	10±4*

*El AMG y/o SNAP fueron añadidos a las 12 y a las 24h de cultivo de las células B16M-F10, respectivamente. Los niveles de NO_x se determinaron 30 horas tras la siembra. El análisis de la expresión de bcl-2 (por RT-PCR) se realizó 36 horas después de la siembra y la medida de los niveles de Bcl-2 se realizó 48 horas después. Los datos representan la media aritmética ± desviación estándar de 5 experimentos realizados. La significación estadística se determinó mediante el test de la t de Student y se expresa como sigue: *p < 0,01 comparando cada valor con el control (medio basal o sin polifenoles añadidos).*

Como se muestra en la tabla 18, la inhibición de iNOS por el AMG va acompañada de un notable descenso en los niveles de NO, en la expresión de *bcl-2* y en los niveles de proteína Bcl-2.

Con 0,3mM de SNAP, los niveles de NO se recuperan hasta valores control, y también la expresión del gen *bcl-2* y la concentración de Bcl-2.

Sin embargo, cuando se añade 3mM de SNAP, aunque el nivel de NO aumenta considerablemente, la expresión de *bcl-2* disminuye y los niveles de Bcl-2 también.

Además, como se muestra en el tabla 18, el efecto de 0,3mM de SNAP, revierte el efecto de *t*-PTER y QUER, e indica que *t*-PTER y QUER reducen la expresión de *bcl-2* vía NO, como el AMG.

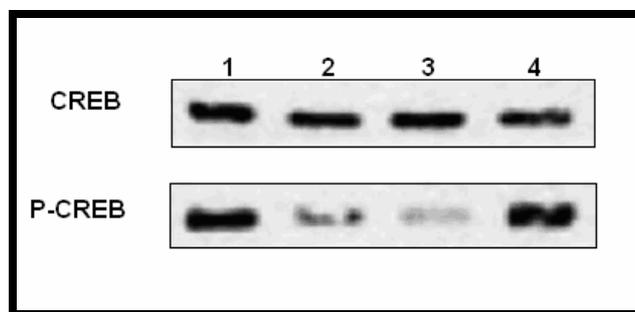
Con estos resultados podemos afirmar que tanto dosis altas de NO como dosis bajas, tienen efecto similar en cuanto a la disminución en expresión de *bcl-2* y los niveles de proteína Bcl-2.

12. Estudio de la actividad de CREB en células B16M-F10 en presencia de *t*-PTER y QUER

Se estudió la influencia de los polifenoles sobre la activación de CREB en células B16M-F10 y los resultados se muestran en la figura 24.

Se ensayaron distintas condiciones, una aplicando AMG, otra aplicando *t*-PTER y QUER, y la tercera aplicando ambos polifenoles junto con SNAP y se comparó la cantidad de CREB fosforilado con respecto a valores control.

Figura 24: Efecto de *t*-PTER y QUER sobre la fosforilación de CREB en los residuos de Ser133 en células B16M-F10



El AMG (2mM) y SNAP (0.3mM) se añadieron a las 24 y 36 horas de cultivo de B16M-F10, respectivamente y 40µM de t- PTER y 20µM de QUER se añadieron (durante una hora) tras 23 horas de cultivo. El extracto celular obtenido 24 horas después de la adición de estos compuestos se analizó mediante Western blott. Las proteínas reaccionaron con anticuerpo específico de P-CREB y CREB. Línea 1, control; línea 2, AMG; línea 3, t-PTER y QUER; línea 4, t-PTER, QUER, y SNAP.

La aplicación de *t*-PTER y QUER produjo una disminución de CREB-P, (CREB fosforilado en el residuo Ser133), al igual que con el inhibidor de iNOS, AMG. La aplicación de los polifenoles, junto con 0,3 mM de SNAP, hizo que se recuperaran los niveles de CREB

fosforilado hasta niveles control: Este efecto se corresponde coherentemente con los resultados de la tabla 18 (véase apartado anterior).

13. Estudio de la activación de N-MSasa y de los niveles de ceramida, a partir del NO liberado por el HSE, en presencia de *t*-PTER y QUER

Se estudió el efecto de *t*-PTER y QUER sobre la actividad de la N-MSasa y sobre los niveles de ceramida en células B16M-F10, durante su interacción con células del HSE eNOS (+/+) y eNOS (-/-). Los datos que se obtuvieron se muestran en la tabla 19.

Tabla 19: Efecto del t-PTER y QUER sobre la actividad de N-SMasa y los niveles de ceramida en B16M-F10 durante la interacción de éstas con el HSE

Adiciones	B16M-F10			
	+eNOS(+/+)		+eNOS(-/-)	
	-----	P+Q	-----	P+Q
N-SMasa(Mg dependiente)	1,26±0,34	2,35±0,55*	1,05±0,23	1,17±30 ⁺
N-SMasa(Mg independiente)	0,50±0,17	0,55±0,14	0,47±0,12	0,52±0,20
SMasa-ác.	7,44±2,10	6,82±1,58	7,59±1,41	7,12±2,00
Ceramida	36±12	75±20*	30±8	34±10 ⁺

Los polifenoles se incubaron a las mismas concentraciones y con el mismo protocolo utilizado en las exposiciones anteriores (véase tabla 11, apartado 4). Se utilizaron células del HSE eNOS (+/+) y células HSE eNOS (-/-), (con el gen eNOS deficiente). Las distintas medidas se llevaron a cabo en células aisladas tras 3 horas de interacción con el endotelio. Los datos representan la media aritmética ± desviación estándar de los 5 experimentos realizados. La significación estadística se determinó con el test de la t de Student y se expresa como sigue: *p< 0,01 comparando t-PTER+QUER con los resultados de estudios sin polifenoles añadidos ⁺p< 0,01 comparando eNOS(-/-) con eNOS (+/+). La actividad de N-SMasa y los niveles de ceramida se expresa como nmol/mg de proteína/hora y como pmol/mg de proteína, respectivamente. Durante la incubación las células tanto del HSE como las B16M-F10 mantuvieron una viabilidad >90%.

Como se muestra en la tabla 19, se produce un aumento de los niveles de ceramida en las células B16M-F10 cocultivadas con células del HSE eNOS (+/+); se comprueba que este fenómeno coincide con el incremento de la activación de la enzima N-SMasa (Mg dependiente). Existe una diferencia a destacar, en los niveles de ceramida y en la actividad y N-SMasa (Mg dependiente), al comparar los ensayos con eNOS (-/-) y eNOS (+/+), siendo en este último caso los valores más elevados.

DISCUSIÓN

1. Biodisponibilidad de *t*-PTER y QUER

La biodisponibilidad y la eficacia biológica son términos que debemos tener en cuenta antes de afirmar que las dietas ricas en polifenoles tienen efectos beneficiosos para la salud (Asensi y cols, 2002; Fremont, 2002; Goldberg y cols 2003).

La biodisponibilidad de los polifenoles depende de la estructura molecular de cada uno y de las reacciones metabólicas que sufren en el organismo. En cualquier caso, la gran mayoría de ellos administrados vía oral, no supera en plasma la concentración de 1 μ M (Scalbert y Williamson, 2000).

Un ejemplo de polifenol que ha demostrado poseer una baja biodisponibilidad es el *trans*-resveratrol (*t*-RESV), un estilbeno de origen vegetal que se aisló de las raíces de una planta medicinal de oriente, *Polygonum Cuspidatum* (Ko-jo-con en japonés) (Nonomura y cols., 1963), que era conocida por sus efectos beneficiosos sobre numerosas enfermedades. Un efecto asociado a su elevado contenido en polifenoles (Hsu y cols., 2007).

El RESV se encuentra en al menos 72 especies vegetales, algunas de las cuales forman parte de nuestra dieta como son las moras, los cacahuetes y las uvas. En el vino se alcanzan concentraciones relativamente importantes, y este hecho es la razón por la cual se le ha atribuido a esta bebida numerosos efectos saludables. Aunque hay que señalar que los estudios *in vitro*, registrados en la literatura, determinan la acción de los polifenoles presentes en el vino a concentraciones muy superiores a las que se encuentran en el plasma. Para hacerse una idea, las concentraciones más bajas utilizadas *in vitro*, fueron diez veces superiores a las concentraciones plasmáticas más elevadas encontradas en condiciones posprandiales (Andriambeloson y cols., 1997).

El RESV ha demostrado tener propiedades anticancerígenas (Jang y cols., 1997; Jang y Pezzuto, 1999; Kimura y Okuda, 2005), cardioprotectoras (Kaga y cols., 2005; Das y cols., 2006; Penumathsa y cols., 2007), y neuroprotectoras (Wang y cols., 2003; Cao y Wang, 2005; Ates y cols., 2007; Hauss y cols., 2007). Incluso, se le ha atribuido la capacidad aumentar la longevidad (Sinclair y cols., 2003). Pero se cuestiona si el RESV podría ejercer efectos *in vivo*.

Se ha demostrado que el efecto antitumoral del RESV está limitado por su baja biodisponibilidad (Asensi y cols., 2002). El RESV se absorbía pero también se eliminaba rápidamente. En consecuencia los niveles que se alcanzaban en plasma

resultaban muy bajos, y no justificaba posibles efectos biológicamente relevantes.

Tras su ingesta, el RESV sufre en el intestino reacciones de glucuronidación (Gunter y cols., 2000), sulfatación e hidrogenación (por la flora intestinal) (Walle y cols., 2004); y tras ser absorbido, sufre este tipo de reacciones metabólicas a nivel hepático (De Santi y cols., 2000).

Esta conjugación, afecta mayoritariamente en los oxígenos de las posiciones 3 y 4' de los anillos aromáticos (Wang y cols., 2001). Siendo más favorable en la posición 3 y más desfavorable cuando la molécula presenta una configuración *trans* (Aumont y cols., 2001).

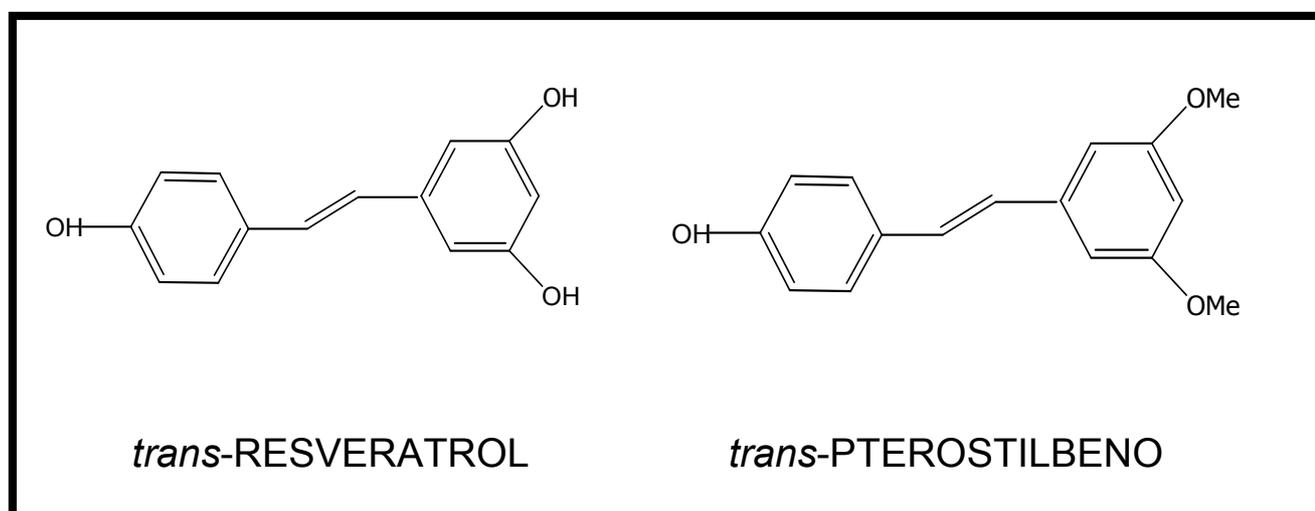
Con el fin de mejorar la biodisponibilidad del RESV, pensamos en una estructura química análoga a éste, donde: a) Se modificaban los grupos estructurales que le hacían ser más susceptible a sufrir reacciones de conjugación (grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5 del segundo anillo); y b) Se conservaban los grupos estructurales responsables de su capacidad antioxidante y antitumoral (grupo hidroxilo en posición 4' y su configuración *trans*) (Stivala y cols, 2001). Con estos requisitos, diseñamos una estructura molecular análoga al *trans-resveratrol* (t-RESV) que coincidía con la estructura de un polifenol natural presente en las plantas del género *Pterocarpus*, el *trans-pterostilbeno* (t-PTER). La raíz de esta planta (*Pterocarpus marsupium*) se conocía por sus

propiedades antibióticas (Manickam y cols., 1997). Además, en estudios recientes se ha comprobado los beneficios que presenta el extracto acuoso de esta planta como reguladora del metabolismo de la glucosa (Grover y cols., 2005).

El *t*-PTER, también ha demostrado tener propiedades anticancerosas por su capacidad antioxidante (Rimando y cols., 2002), como inductor de la apoptosis en líneas de linfoma muy agresivas (Tolomeo y cols., 2005) y en carcinoma gástrico humano (Pan y cols., 2007). Recientemente se le ha atribuido además propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Remsberg y cols., 2007).

Pensamos que el *t*-PTER además de presentar múltiples beneficios para la salud, presentaría una mayor biodisponibilidad, por el hecho de tener los oxígenos de los grupos hidroxilo en posición 3 y 5, protegidos por grupos metilo de las posibles reacciones metabólicas del organismo (véase figura 25).

Figura 25: Estructura química del *t*-RESV y del *t*-PTER



Además, con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad del *t*-PTER, añadimos a nuestros ensayos otro polifenol, la quercetina (QUER). Un flavonoide presente en muchos alimentos de nuestra dieta al que también se le han adscrito propiedades antitumorales (Lamson y Brignall, 2000; Ross y Kasum, 2002; Orsolic y cols., 2004; Devipriya y cols., 2006) y que compite con el *t*-RESV por el metabolismo hepático (De Santi, 2000). Consecuentemente, también competirá con su análogo, el *t*-PTER.

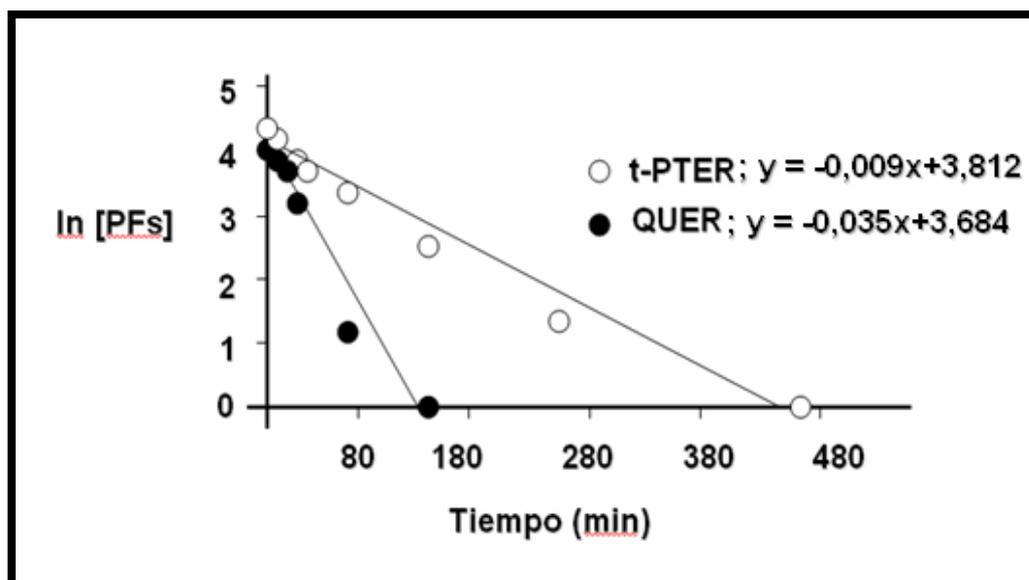
Con el fin de determinar la biodisponibilidad del *t*-PTER y la QUER, realizamos distintos estudios farmacocinéticos.

En primer lugar, administramos vía oral dosis de 20 mg/kg de *t*-PTER o QUER, dosis que había sido utilizadas por Asensi y cols. (2002), en sus estudios con el *t*-RESV; y las concentraciones plasmáticas detectadas de *t*-PTER y QUER fueron más elevadas que las obtenidas cuando se administraba el *t*-RESV (véase tabla 7, apartado 1 de “Resultados”) pero sin embargo, insuficientes para que pudieran ejercer un efecto antitumoral significativo en el organismo.

Cuando se administró la misma dosis vía i.v., se obtuvieron concentraciones plasmáticas mucho más elevadas (véase tabla 8, apartado 1 de “Resultados”). A partir de estos niveles plasmáticos, representando linealmente los valores de los logaritmos neperianos de las concentraciones plasmáticas obtenidas, pudimos calcular la semivida biológica de *t*-PTER y

QUER que era de 77,9 y 20,1min, respectivamente (véase siguiente figura):

Figura 26: Logaritmo neperiano de los niveles plasmáticos vs tiempo.



Teniendo en cuenta que la semivida del RESV era de 14,4min (Asensi y cols., 2002), los resultados obtenidos ofrecían una mejora posible en la eficacia biológica.

A partir de dichas concentraciones (véase tabla 8, apartado 1 de “Resultados”), calculamos la concentración plasmática media durante la primera hora tras la administración i.v. de cada uno: 40 μ M para el t-PTER y 20 μ M para la QUER.

Por tanto, con las modificaciones estructurales propuestas conseguimos aumentar la biodisponibilidad tras la

administración i.v. Estas concentraciones aplicadas sólo durante 1 hora/día, en estudios *in vitro*, nos aproximan a lo que puede ocurrir *in vivo* si administramos al animal una dosis diaria de 20 mg/kg de t-PTER y/o kg de QUER vía i.v.

Por otra parte, observamos que la rápida eliminación de los polifenoles estudiados a partir del plasma no se debe a un acúmulo extravascular (véase tabla 9, apartado 2 de los "Resultados").

2. Efecto de t-PTER y QUER sobre la proliferación tumoral *in vitro*

Estudiamos los efectos anticancerosos del t-PTER y/o QUER a concentraciones biodisponibles. En algunos casos, lo comparamos con el efecto de 12 µM de t-RESV aplicado solamente durante 1 h/día (concentración media durante la primera hora tras la administración de 20 mg/kg de t-RESV vía i.v.; Asensi y cols., 2002)

El modelo tumoral utilizado fue el de melanoma B16 murino, concretamente una línea tumoral muy agresiva, la B16M-F10, bien diferenciada, con alta capacidad metastásica, y que satisface todos los requisitos bioquímicos demandados para el presente trabajo.

Tras la administración i.v. se obtuvieron unas concentraciones de t-PTER y QUER (tabla 10, apartado 3 de "Resultados") que

inhibieron *in vitro* el crecimiento tumoral ~ un 56% sin incrementar el índice de muerte celular. Ello sugirió que el *t*-PTER y la QUER actuarían como rápidas señales moduladoras del mecanismo de división celular.

Basándonos, en la biodisponibilidad de estos polifenoles y en los resultados de la tabla 10, seleccionamos la combinación de *t*-PTER y QUER para el estudio de su efecto en la progresión metastásica. Investigamos así, el efecto del *t*-RESV, *t*-PTER, QUER, y las posibles combinaciones entre ellos, sobre la interacción *in vitro* del HSE con las células B16M-F10. Paralelamente al efecto sobre el crecimiento tumoral (véase tabla 10 de “Resultados”), la asociación de *t*-PTER y QUER fue la más efectiva en cuanto a la disminución del % de células B16M-F10 adheridas al HSE y en cuanto al incremento del % de citotoxicidad producida por el endotelio (véase tabla 11 de “Resultados”).

Selectinas, integrinas, cadherinas, inmunoglobulinas, etc., están implicadas en la unión (“docking”) entre las células metastásicas y las del endotelio, que son uniones débiles y transitorias (Ortega y cols., 2003). Este mecanismo de interacción incluye un receptor de manosa que media la unión entre las células tumorales y el HSE. Esta unión estimula al endotelio para que libere citoquinas proinflamatorias y agentes oxidantes como el NO y el H₂O₂; así como para que se exprese VCAM-1, una proteína de adhesión intercelular, que refuerza la

unión entre ambos tipos celulares (“locking”) y facilita la liberación de factores de crecimiento del melanoma (Mendoza y cols., 1998).

En la unión (“locking”) participa la proteína de adhesión VLA-4 de las células tumorales que se adhieren al endotelio a través de la VCAM-1, un proceso bien conocido. Garofalo y cols., (1995) vieron que células de melanoma A375M humano expresaban niveles altos de VLA-4, y que ésta se unía con la proteína de adhesión VCAM-1. Este proceso de unión es un paso crítico que precede al mecanismo de extravasación e invasión de las células B16M-F10. Aunque ello, no excluye otros mecanismos moleculares que puedan intervenir u otro tipo de uniones que tengan las distintas células metastásicas con el endotelio (Orr y cols., 2000).

En nuestros estudios vimos que el *t*-PTEr inhibía la expresión de VCAM-1 en el HSE, disminuyendo la adhesión de las células B16M-F10 al endotelio vía VLA-4 (tabla 12 apartado 5 de “Resultados”); y que tanto *t*-PTEr como QUER (esta última en mayor medida) indujeron cambios en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, aumentando la expresión de genes proapoptóticos y disminuyendo la expresión de los antiapoptóticos en células B16M-F10 (tabla 13 apartado 6 de “Resultados”). Un hecho que hacía que las células tumorales fueran más sensibles a la citotoxicidad provocada por el HSE (véase tabla 14). Experimentos realizados *in vitro* demostraron

que la QUER potenciaba la apoptosis en células promielocíticas humanas HL-60 (Shen y cols, 2003) y en células de melanoma murino B1-BL6 (Zhang y cols, 2000) sugiriendo como causa de ello una disminución en la expresión de Bcl-2.

Debido a la semejanza estructural del *t*-PTER con el *t*-RESV, los resultados óptimos que íbamos obteniendo con el *t*-PTER se veían apoyados por estudios que se habían realizado con el *t*-RESV: a) por un lado inhibía la expresión de VCAM-1 en células endoteliales, disminuyendo así la adhesión de las células tumorales al endotelio [algunos estudios demostraban que también podía inhibir la expresión de ICAM en granulocitos (Ferrero y cols., 1998)]; y b) por otro lado inducía apoptosis disminuyendo la expresión de Bcl-2 (antiapoptótica) y aumentando la expresión de BAX (proapoptótica) (Tessitore y cols., 2000). Aunque los resultados de la tabla 14 (apartado 7), sugieren que la apoptosis de las células tumorales es independiente del gen BAX (Mahyar-Roemer y cols, 2002; Pervaiz, 2003).

Sería muy interesante estudiar también si el *t*-PTER y/o la QUER tienen *in vivo* un carácter antiangiogénico como se demostró con el *t*-RESV y la QUER *in vitro* (Igura y cols., 2001).

3. Efecto antitumoral del *t*-PTER y QUER *in vivo*

Para poder aproximar una posible aplicación del *t*-PTER y QUER, investigamos su capacidad antimetástasica *in vivo* frente a células B16M-F10. Así mismo planteamos la posibilidad de que los huéspedes sobrevivieran durante más tiempo.

Con estos objetivos administramos *t*-PTER y QUER vía i.v. (20mg/kg peso cada día). Vimos que las B16M-F10 tratadas con *t*-PTER y QUER tenían bajo nivel de Bcl-2 y, como era de esperar (Ortega y cols., 2003), resultaron más sensibles a la citotoxicidad producida por el endotelio. Esto, sumado al efecto inhibitorio sobre la adhesión, mediado por el *t*-PTER, hizo que el crecimiento metastásico de dichas células disminuyese considerablemente al cabo de 10 días y aumentara, en gran medida, el número de días de la supervivencia de los animales (véase tabla 14).

Sin embargo, cuando realizamos ensayos idénticos pero con células B16M-F10 que sobreexpresaban Bcl-2, disminuyó la citotoxicidad provocada por el endotelio y ni el crecimiento metastásico, tras 10 días de tratamiento, ni el número de días de supervivencia de los animales se vieron incrementados de modo significativo.

Nuestros resultados sugerían que niveles elevados de Bcl-2 podían ejercer un efecto protector y que, consecuentemente,

una terapia antitumoral anti-Bcl-2 podría mejorar la eficacia de la terapia anticancerosa (Jason y cols., 2004).

En cuanto a la administración de los polifenoles es importante resaltar que si se demostrara que fuesen efectivos y no tóxicos para el ser vivo, la dosis podría ir en aumento. Además, la administración vía oral también podría aportar beneficios, de hecho esta idea es apoyada por la observación de que se vio que el *t*-RESV inhibía la expresión de VCAM-1 a bajas concentraciones (1 μ M) (Asensi y cols., 2002). También tendríamos que considerar el metabolismo que sufren este tipo de polifenoles (Bravo y cols., 1998; Marier y cols., 2002; Golberg y cols., 2003; Walle, 2004) y los efectos de sus metabolitos (glucuronidos o sulfatados) (Wang y cols., 2004), así como el tipo de células tumorales susceptibles de ser tratadas. Además, la asociación de *t*-PTER y de QUER podría servir para tratar las patologías asociadas al estrés oxidativo, como la diabetes, la arteriosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas, las isquemias coronarias (Davies, 1995). Las dosis para tratar distintas enfermedades podrían ser muy diferentes, dependiendo de cada patología y de cada enfermo.

4. Implicaciones moleculares en el efecto antitumoral de la asociación de *t*-PTER y QUER

La incubación de las células B16M-F10 con *t*-PTER y QUER, durante un tiempo corto y a concentraciones biodisponibles, inhibió la expresión del gen que codifica la iNOS (véase figura 22 de “Resultados”) y la generación de NO (véase tabla 15 de “Resultados”). El descenso de NO en las células tumorales supuso una disminución en la activación del factor de transcripción CREB (su fosforilación) y una disminución de la expresión de Bcl-2 (véase tabla 18 de “Resultados”).

Por otro lado, la asociación de *t*-PTER y QUER aumentó la expresión de eNOS, enzima expresada en el endotelio vascular (véase figura 23 de “Resultados”) facilitando que se liberara mayor cantidad de NO durante la interacción del endotelio con las células tumorales. Y con ello favoreciendo la citotoxicidad de las células tumorales (véase tablas 16 y 17 de “Resultados”). En algunos estudios se demostró que tanto el *t*-RESV (Wallerath y cols., 2002), la QUER (Chiesi y cols., 1995), así como otros polifenoles (Pechanova y cols., 2006; Rhatel y cols., 2007), aumentaban la expresión de eNOS.

Además, durante la adhesión de las B16M-F10 con el endotelio, la asociación de *t*-PTER y QUER indujo un incremento en la actividad de la esfingomielinasa neutra (N-SMasa), dependiente de NO, en células cancerígenas. Por tanto, se produjo un aumento en los niveles de ceramida

presente en el citosol celular. El NO y la ceramida actuaron como mediadores moleculares en la apoptosis inducida por la depleción de Bcl-2 en células B16M-F10 (véase tabla 18 y 19 de “Resultados”).

El NO se comporta de un modo paradójico. Por una parte concentraciones altas de NO inducen apoptosis (Chung y cols, 2001), pudiendo estar implicado en este fenómeno el estado redox de la célula y la formación de complejos con metales de transición (Carretero y cols., 2001; Moncada y cols., 1991; Nathan, 1992). Este mecanismo apoya la idea de que una activación de eNOS puede favorecer a la muerte celular e inhibir la invasión metastásica (Xie y cols., 1996). Por otra parte, una baja concentración de NO puede también inducir a la apoptosis celular (Chung y cols, 2001). Se observó que el AMG, que inhibe la síntesis de NO endógeno, no afectaba al ciclo celular pero causaba muerte por apoptosis (Salvucci y cols, 2001). Además se vio que, *in vitro*, el *t*-RESV inducía apoptosis de las células B leucémicas por inhibición de la expresión de la iNOS (Roman y cols, 2000; Kim y cols., 2006). Pero este efecto se producía en las 48h de cultivo de células B leucémicas, a concentraciones no biodisponibles: Una concentración 10-50 μ M de *t*-RESV disminuyó la expresión de iNOS entre un 50-90%; y 50 μ M de *t*-RESV disminuyó los niveles de Bcl-2 entre un 25-60% (Roman y cols, 2000). Otros

estudios han demostrado también que los polifenoles del té son responsables de la inhibición de iNOS (Yuan y cols., 2006).

Como antes se ha explicado, tanto *t*-PTER como QUER, disminuyeron la expresión de Bcl-2 (véase tabla 13, apartado 6 de “Resultados”), y ambos demostraron un efecto sinérgico en la liberación de NO por las células endoteliales y tumorales (véase tablas 15 y 16 de “Resultados”). Es obvio pensar que ambos polifenoles juntos deben ser más efectivos que separados.

Existen muchos estudios donde se ha demostrado que el NO influye en gran medida en la expresión del gen antiapoptótico *bcl-2* (Korzekwa y cols., 2006; Guan y cols., 2007; Rishi y cols., 2007), un hecho que apoya a nuestros resultados (véase tabla 18 de “Resultados”).

Además, demostramos que había una relación directa entre la inhibición de la iNOS en células metastásicas y la presencia de ambos polifenoles a concentraciones biodisponibles. El NO se relaciona directamente con CREB (Galea y Feinstein, 1999; Pilz y Casteel, 2003; Zhuravliova y cols., 2007).

El factor de crecimiento CREB, y las proteínas asociadas a él, actúan como factores de supervivencia en las células de melanoma humanas (Jean y cols, 1998). Comprobamos por Western blot que la disminución de NO liberado por las células tumorales, debido a la presencia de *t*-PTER y QUER y del

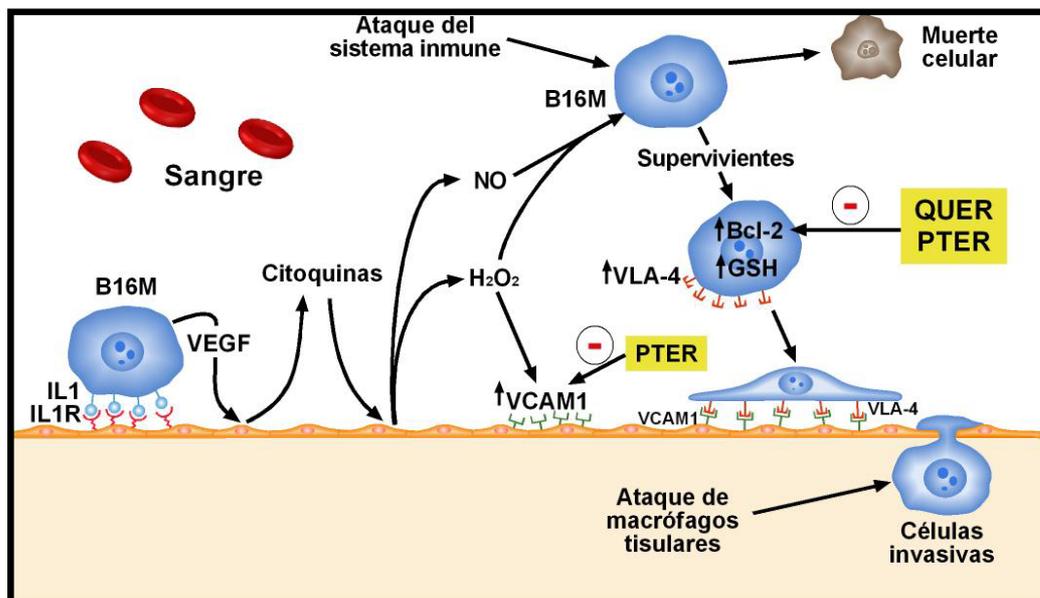
inhibidor de iNOS, AMG, llevaba a un descenso en la activación de CREB (descenso de CREB fosforilado) (véase figura 24 de “Resultados”) (la disminución de la expresión de CREB por polifenoles ya había sido sugerida por Iijima y cols. en el 2000). Sin embargo, esta activación se recuperaba con el aumento de NO por parte del dador de NO, SNAP a concentraciones adecuadas.

La disminución de CREB fosforilado interfiere con el cGMP dependiente de proteína kinasa, la ruta más importante activada por el NO (Pilz y Casteel, 2003). Por otro lado, el aumento de NO liberado por el endotelio provoca un aumento de la presencia de ceramida (véase tabla 19), un potente activador de la apoptosis. El aumento de ceramida causa un aumento en la expresión de p53, gen supresor de tumores, lo que provoca una disminución en la expresión de *bcl-2* (Kolb, 2000; Kim y cols, 2002). Recientemente, se demostró que p53 provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa mediante la formación de complejos con las proteínas antiapoptóticas, Bcl-xL y Bcl-2 (Mihara y cols, 2003). El p53 promueve la expresión de genes proapoptóticos como *bax*, o actúa activando la transcripción de los genes inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina como el p21 (Kolb, 2000). Entonces, la asociación de t-PTER y QUER, teóricamente, podría actuar *in vivo* a través de diferentes pasos y mecanismos contra la progresión tumoral.

Que estos polifenoles incluyan dentro de sus mecanismos la regulación de la liberación de NO, abre una puerta con implicaciones para el tratamiento de numerosas enfermedades en las que esta molécula juega un papel importante (Hollenberg, 2006; Malinski, 2007).

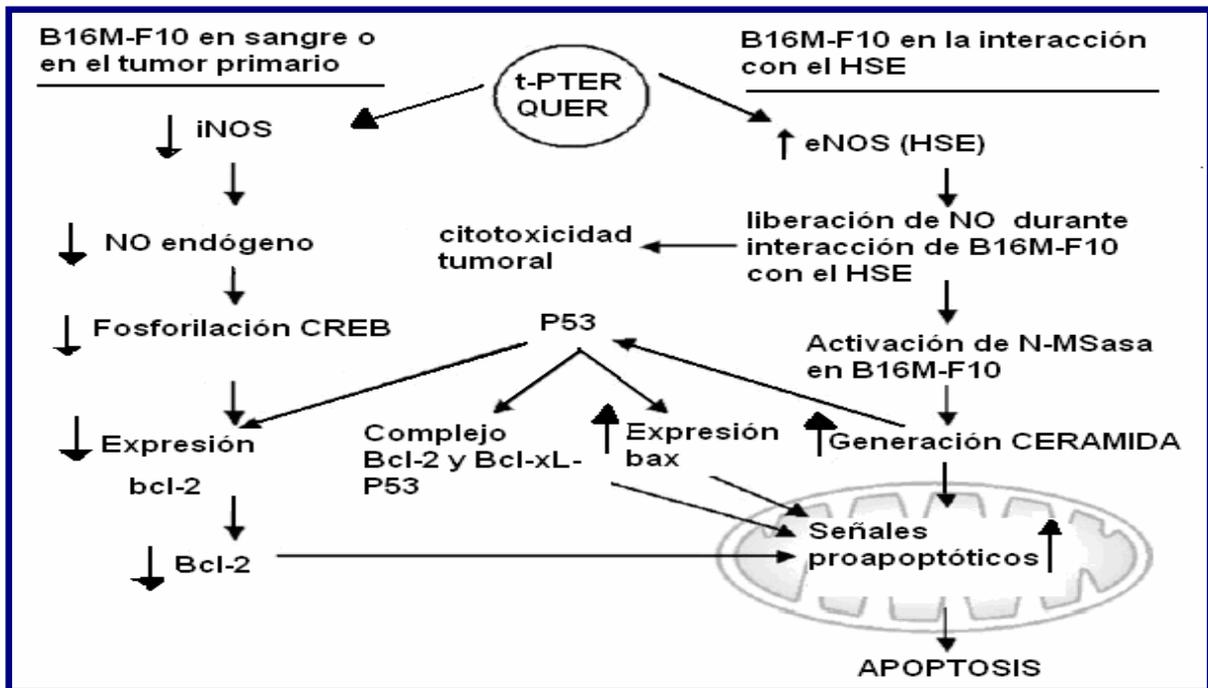
Las figuras 27 y 28 muestran los resúmenes de los posibles mecanismos de acción antimetastásica del *t*-PTER y de la QUER sobre el melanoma B16M-F10.

Figura 27: Resumen 1 de los mecanismos de acción de *t*-PTER y QUER



El resumen 1 muestra que durante la adhesión de las B16M-F10 con el HSE, el t-PTER inhibe la expresión de VCAM-1 en el HSE y que el tanto el t-PTER como la QUER, inhiben la expresión de bcl-2 en las B16M-F10.

Figura 28: Resumen 2 de los mecanismos de acción de t-Pter y QUER



El resumen 2 muestra que el t-Pter y la QUER disminuyen la expresión de iNOS, la fosforilación de CREB y la consiguiente expresión de bcl-2 en las B16M-F10 durante la etapa previa a la interacción con el endotelio, y además, se muestra que durante la interacción de las B16M-F10 con el HSE, el t-Pter y la QUER aumentan la expresión de eNOS en las células del HSE, induciendo a la citotoxicidad tumoral y provocan la apoptosis de las B16M-F10 debido a que éstos activan la N-SMasa, que lleva a la liberación de ceramida desde la pared mitocondrial.

En resumen, hemos visto que la asociación de t-PTER y QUER, a concentraciones biodisponibles, tiene efectos antimetástásicos sobre el melanoma B16M-F10 *in vitro* e *in vivo* aumentando, incluso, la supervivencia de los animales de experimentación.

Este efecto implica distintos mecanismos, incluyendo los relacionados con la liberación de NO, y requiere además de la administración vía i.v.

CONCLUSIONES

1. La biodisponibilidad de t-PTER y QUER tras la administración oral es baja, no alcanzándose las concentraciones plasmáticas necesarias para la inhibición del crecimiento de las células de melanoma B16M-F10 *in vivo*. Sin embargo, cuando los polifenoles se administran vía intravenosa sí que se alcanzan concentraciones plasmáticas efectivas. Además, ni el t-PTER ni la QUER, se acumulan en tejidos extravasculares.
2. El t-PTER reduce la adhesión de las células B16M-F10 al HSE, mientras que la QUER induce citotoxicidad en células de melanoma B16M-F10 adheridas al endotelio *in vitro* e *in vivo*.
3. La disminución de la expresión del gen antiapoptótico bcl-2 en las células de melanoma B16M-F10 se debe a la presencia de ambos polifenoles. Por una parte disminuyen los niveles de NO generados por las células tumorales y, por otra, aumentan los niveles de NO generados por las células del HSE durante su interacción con las células tumorales.
4. La administración i.v. de t-PTER y QUER, reduce considerablemente la actividad metastásica de las células

B16M-F10 en el hígado y aumenta la supervivencia de los animales de experimentación.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Adams, J.M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *In Science*. Vol. 281: 1322-6.
- ✓ Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:7915-22.
- ✓ Andriambeloson, E., A.L. Kleschvov, B. Muller, A. Beretz, J.C. Stoclet, R. Andriantsitohaina. 1997. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*; 120(6):1053-8.
- ✓ Anasagasti, M.J., A. Alvarez, J.J. Martin, L. Mendoza, and F. Vidal-Vanaclocha. 1997. Sinusoidal endothelium release of hydrogen peroxide enhances very late antigen-4-mediated melanoma cell adherence and tumor cytotoxicity during interleukin-1 promotion of hepatic melanoma metastasis in mice. *Hepatology*. 25:840-6.
- ✓ Anasagasti, M.J., J.J. Martin, L. Mendoza, E. Obrador, J.M. Estrela, R.S. McCuskey, and F. Vidal-Vanaclocha. 1998. Glutathione protects metastatic melanoma cells against

oxidative stress in the murine hepatic microvasculature. *Hepatology*. 27:1249-56.

✓ Arrigo, A.P. 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 27:936-44.

✓ Arvelo, F., and M.F. Poupon. 2001. [Molecular and cell aspects of the cancer metastasis]. *Acta Cient Venez*. 52:304-12.

✓ Asensi, M., I. Medina, A. Ortega, J. Carretero, M.C. Bano, E. Obrador and J.M. Estrela, 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic Biol Med*. 33,387-398.

✓ Ates, O., S. Cayli, E. Altinoz, I. Guises, N. Yucel, M. Sener, A. Kocak, S. Yologhi. 2007. Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injure in rats. *Mol Cell Biochem*. Jan;294(1-2):137-44.

✓ Auerbach, R., L. Alby, L.W. Morrissey, M. Tu, and J. Joseph. 1985. Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res*. 29:401-11.

✓ Aumont, V., S. Krisa, E. Bahaglia, P. Netter, T. Richard, J.M. Merillon, J. Magdalou, N. Sabolovic. 2001. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Arch. Biochem Biophys*; 393(2):281-9.

- ✓ Azam S., Hadi N, Khan NU, Hadi SM. 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro.*; 18(5):555-61.
- ✓ Baluk, P., S. Morikawa, A. Haskell, M. Mancuso, and D.M. McDonald. 2003. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 163:1801-15.
- ✓ Basbaum, C.B., and Z. Werb. 1996. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr Opin Cell Biol.* 8:731-8.
- ✓ Becker, K.F., M.J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J.R. Siewert, and H. Hofler. 1994. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 54:3845-52.
- ✓ Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3:401-10.
- ✓ Bergmeyer, H. U. (1985) *Methods in Enzymatic Analyses.* Ed. Academic Press, NY.
- ✓ Bevilacqua, M.P., S. Stengelin, M.A. Gimbrone, Jr., and B. Seed. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 243:1160-5.

✓ Bigg, H.F., Y.E. Shi, Y.E. Liu, B. Steffensen, and C.M. Overall. 1997. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem.* 272:15496-500.

✓ Billard C, Izard JC, Roman V, Kern C, Mathiot C, Mentz F and Kolb JP. 2002. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk Lymphoma*; 43(10):1991-2002

✓ Birchmeier, W., and J. Behrens. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1198:11-26.

✓ Biroccio, A., C. Leonetti, and G. Zupi. 2003. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene.* 22:6579-88.

✓ Blasi, F. 1993. Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness. *J Surg Oncol Suppl.* 3:21-3.

✓ Borgers, M., L.G. Shu, R. Xhonneux, F. Thone, and P. Van Overloop. 1987. Changes in ultrastructure and Ca²⁺

distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia. A time-related study. *Am J Pathol.* 126:92-102.

✓ Bos, J.L. 1998. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *Embo J.* 17:6776-82.

✓ Boveris, A., and B. Chance. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134:707-16.

✓ Boyd, J.M., G.J. Gallo, B. Elangovan, A.B. Houghton, S. Malstrom, B.J. Avery, R.G. Ebb, T. Subramanian, T. Chittenden, R.J. Lutz, and et al. 1995. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene.* 11:1921-8.

✓ Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

✓ Braman, R.S. and Hendrix S.A. 1989. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* 61(24): 2715-8.

✓ Brennan, P.A., I.P. Downie, J.D. Langdon, and G.A. Zaki. 1999. Emerging role of nitric oxide in cancer. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 37:370-3.

✓ Brodt, P., L. Fallavollita, R.S. Bresalier, S. Meterissian, C.R. Norton, and B.A. Wolitzky. 1997. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer*. 71:612-9.

✓ Brooks, P.C., A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, and D.A. Cheresh. 1994. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 79:1157-64.

✓ Brooks, P.C., S. Stromblad, L.C. Sanders, T.L. von Schalscha, R.T. Aimes, W.G. Stetler-Stevenson, J.P. Quigley, and D.A. Cheresh. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 85:683-93.

✓ Brown, L.F., A.J. Guidi, S.J. Schnitt, L. Van De Water, M.L. Iruela-Arispe, T.K. Yeo, K. Tognazzi, and H.F. Dvorak. 1999. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*. 5:1041-56.

✓ Buckley, I.K. 1972. A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells. *Lab Invest*. 26:201-9.

✓ Bukowski, D.M., S.M. Deneke, R.A. Lawrence, and S.G. Jenkinson. 1995. A noninducible cystine transport system in rat alveolar type II cells. *In Am J Physiol*. Vol. 268. L21-6.

- ✓ Burdon, R.H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *In Free Radic Biol Med.* Vol. 18. 775-94.
- ✓ Burdon, R.H., D. Alliangana, and V. Gill. 1995. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells. *In Free Radic Res.* Vol. 23. 471-86.
- ✓ Burrows, F.J., D.O. Haskard, I.R. Hart, J.F. Marshall, S. Selkirk, S. Poole, and P.E. Thorpe. 1991. Influence of tumor-derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions in vitro. *Cancer Res.* 51:4768-75.
- ✓ Butler, G.S., S.S. Apte, F. Willenbrock, and G. Murphy. 1999. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *J Biol Chem.* 274:10846-51.
- ✓ Cadenas, E. 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med.* 25:17-26.
- ✓ Cadenas, E., A. Boveris, C.I. Ragan, and A.O. Stoppani. 1977. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *In Arch Biochem Biophys.* Vol. 180. 248-57.
- ✓ Cai, J., Z.Z. Huang, and S.C. Lu. 1997. Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem J.* 326 (Pt 1):167-72.

- ✓ Cameron, M.D., E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, K.V. Nadkarni, V.L. Morris, A.C. Groom, A.F. Chambers, and I.C. MacDonald. 2000. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 60:2541-6.
- ✓ Cao, G., E. Sofic, R.L. Prior, 1997. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure- activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*22: 749-60.
- ✓ Cao, Z.B. and G.Y. Hu. 2005. Neuroprotection by resveratrol against cytotoxicity of oxidized low density lipoprotein in PC12 cells; 39(1): 19-21.
- ✓ Carlos, T.M., and J.M. Harlan. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84: 2068-101.
- ✓ Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6:389-95.
- ✓ Carretero, J., E. Obrador, M.J. Anasagasti, J.J. Martin, F. Vidal-Vanaclocha, and J.M. Estrela. 1999. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 17:567-74.
- ✓ Carretero, J., E. Obrador, J.M. Esteve, A. Ortega, J.A. Pellicer, F.V. Sempere, and J.M. Estrela. 2001. Tumoricidal activity of endothelial cells. Inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic

sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 276:25775-82.

✓ Carretero, J., E. Obrador, J.A. Pellicer, A. Pascual, and J.M. Estrela. 2000. Mitochondrial glutathione depletion by glutamine in growing tumor cells. *Free Radic Biol Med.* 29:913-23.

✓ Casey M., J. Leonard, B. Lygo, G. Procter. 1990. *Advanced Practical Organic Chemistry. Ed. Blackie .Glasgow and London.*

✓ Cavalli, L.R., and B.C. Liang. 1998. Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *In Mutat Res.* Vol. 398. 19-26.

✓ Chambers, A.F., and L.M. Matrisian. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 89:1260-70.

✓ Chang, L., and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410:37-40.

✓ Chang, Y.S., Y.Q. Chen, J. Timar, K.K. Nelson, I.M. Grossi, L.A. Fitzgerald, C.A. Diglio, and K.V. Honn. 1992. Increased expression of alpha IIb beta 3 integrin in subpopulations of murine melanoma cells with high lung-colonizing ability. *Int J Cancer.* 51:445-51.

- ✓ Cheeseman, K.H., and T.F. Slater. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *In Br Med Bull.* Vol. 49. 481-93.
- ✓ Clarke, P.G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 181:195-213.
- ✓ Cogswell, P.C., D.F. Kashatus, J.A. Keifer, D.C. Guttridge, J.Y. Reuther, C. Bristow, S. Roy, D.W. Nicholson, and A.S. Baldwin, Jr. 2003. NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem*. 278:2963-8.
- ✓ Colell, A., O. Coll, C. Garcia-Ruiz, R. Paris, C. Tiribelli, N. Kaplowitz, and J.C. Fernandez-Checa. 2001. Tauroursodeoxycholic acid protects hepatocytes from ethanol-fed rats against tumor necrosis factor-induced cell death by replenishing mitochondrial glutathione. *In Hepatology*. Vol. 34. 964-71.
- ✓ Colell, A., O. Coll, M. Mari, J.C. Fernandez-Checa, and C. Garcia-Ruiz. 2002. Divergent role of ceramide generated by exogenous sphingomyelinases on NF-kappa B activation and apoptosis in human colon HT-29 cells. *In FEBS Lett*. Vol. 526. 15-20.

- ✓ Colell, A., C. Garcia-Ruiz, J.M. Lluís, O. Coll, M. Mari, and J.C. Fernandez-Checa. 2003. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *In J Biol Chem*. Vol. 278. 33928-35.
- ✓ Condeelis, J., and J.E. Segall. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*. 3:921-30.
- ✓ Costantini, P., E. Jacotot, D. Decaudin, and G. Kroemer. 2000. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 92:1042-53.
- ✓ D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. Vol. 43, no. 4: 348-361.
- ✓ Das, D.K. and N. Maulik. 2006. Resveratrol cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol.Interv*. 6 (1): 36-47.
- ✓ Das, S. and D.K. Das. 2007. Antiinflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets*; 6(3): 168-73.
- ✓ Datta, R., D.E. Hallahan, S.M. Kharbanda, E. Rubin, M.L. Sherman, E. Huberman, R.R. Weichselbaum, and D.W. Kufe. 1992. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry*. 31:8300-6.

- ✓ Day, B.J., A.M. van Heeckeren, E. Min, and L.W. Velsor. 2004. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary pseudomonas infection. *Infect Immun.* 72:2045-51.
- ✓ De Boer, W.I., A.B. Houtsmuller, V. Izadifar, B. Muscatelli-Groux, T.H. Van der Kwast, and D.K. Chopin. 1997. Expression and functions of EGF, FGF and TGFbeta-growth-factor family members and their receptors in invasive human transitional-cell-carcinoma cells. *Int J Cancer.* 71:284-91.
- ✓ De Duve, C., and P. Baudhuin. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46:323-57.
- ✓ De Santi, C., A. Pietrabissa, R. Spisni, F.Mosca, G.M. Pacifici, 2000. Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*, 30(9): 857-66
- ✓ Dean, N.M., and C.F. Bennett. 2003. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene.* 22:9087-96.
- ✓ Demarex, N., and C. Distelhorst. 2003. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science.* 300:65-7.
- ✓ Devipriya, S., V. Ganapathy and C.S. Shyamaladevi. 2006. Supression of tumor growth and invasion in 9, 10-dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by

the plant bioflavonoid quercetin. *Chem Biol Interact*; 162(2): 106-13.

✓ Dhaene, K., E. Van Marck, and R. Parwaresch. 2000. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch*. 437:1-16.

✓ Dias, N., and C.A. Stein. 2002. Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm*. 54:263-9.

✓ Distelhorst, C.W., and G.C. Shore. 2004. Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene*. 23:2875-80.

✓ Dong, Z., A.H. Staroselsky, X. Qi, K. Xie, and I.J. Fidler. 1994. Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells. *Cancer Res*. 54:789-93.

✓ Dougherty, G.J., D.L. Cooper, J.F. Memory, and R.K. Chiu. 1994. Ligand binding specificity of alternatively spliced CD44 isoforms. Recognition and binding of hyaluronan by CD44R1. *J Biol Chem*. 269:9074-8.

✓ Dreher, D., and A.F. Junod. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*. 32A:30-8.

- ✓ Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.
- ✓ Dulak, J. 2005. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *J Physiol Pharmacol*. 56 Suppl 1:51-67.
- ✓ Eissa, S., and L.S. Seada. 1998. Quantitation of Bcl-2 protein in Bladder cancer tissue by enzyme immunoassay: comparison with western blot and immunohistochemistry. *Clin. Chem*. 44(7):1423-9.
- ✓ Eliopoulos, A.G., D.J. Kerr, J. Herod, L. Hodgkins, S. Krajewski, J.C. Reed, and L.S. Young. 1995. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*. 11:1217-28.
- ✓ Ellerby, L.M., H.M. Ellerby, S.M. Park, A.L. Holleran, A.N. Murphy, G. Fiskum, D.J. Kane, M.P. Testa, C. Kayalar, and D.E. Bredesen. 1996. Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *In J Neurochem*. Vol. 67. 1259-67.
- ✓ Engers, R., and H.E. Gabbert. 2000. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol*. 126:682-92.

✓ Esposti, M.D., I. Hatzinisiriou, H. McLennan, and S. Ralph. 1999. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *In J Biol Chem*. Vol. 274. 29831-7.

✓ Estrela, J.M., R. Hernandez, P. Terradez, M. Asensi, I.R. Puertes, and J. Vina. 1992. Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem J*. 286 (Pt 1):257-62.

✓ Estrela, J.M., E. Obrador, J. Navarro, M.C. Lasso De la Vega, and J.A. Pellicer. 1995. Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nat Med*. 1:84-8.

✓ Estrela, J.M., A.L. Ortega, and J. Carretero. 2004. A role for the 2-oxoglutarate carrier in glutathione transport into hepatocyte mitochondria? *In Hepatology*. Vol. 39. 570-1; author reply 571.

✓ Fairfield, K.M., S.E. Hankinson, B.A. Rosner, D.J. Hunter, G.A. Colditz, and W.C. Willett. 2001. Risk of ovarian carcinoma and consumption of vitamins A, C, and E and specific carotenoids: a prospective analysis. *Cancer*. 92:2318-26.

✓ Farias-Eisner, R., G. Chaudhuri, E. Aeberhard, and J.M. Fukuto. 1996. The chemistry and tumoricidal activity of

nitric oxide/hydrogen peroxide and the implications to cell resistance/susceptibility. *J Biol Chem.* 271:6144-51.

✓ Farrow, S.N., and R. Brown. 1996. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev.* 6:45-9.

✓ Felley-Bosco, E., J. Mirkovitch, S. Ambs, K. Mace, A. Pfeifer, L.K. Keefer, and C.C. Harris. 1995. Nitric oxide and ethylnitrosourea: relative mutagenicity in the p53 tumor suppressor and hypoxanthine-phosphoribosyltransferase genes. *Carcinogenesis.* 16:2069-74.

✓ Fernandes, A.P., and A. Holmgren. 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal.* 6:63-74.

✓ Fidler, I.J. 1973a. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur J Cancer.* 9:223-7.

✓ Fidler, I.J. 1973b. Selection of successive tumour lines for metastasis. *In Nat New Biol.* Vol. 242. 148-9.

✓ Fidler, I.J. 1984. Recent concepts of cancer metastasis and their implications for therapy. *Cancer Treat Rep.* 68:193-8.

- ✓ Fidler, I.J. 1990. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 50:6130-8.
- ✓ Fidler, I.J. 2000. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J.* 6 Suppl 2:S134-41.
- ✓ Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3:453-8.
- ✓ Fidler, I.J., and I.R. Hart. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science.* 217:998-1003.
- ✓ Fidler, I.J., and G.L. Nicolson. 1977. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst.* 58:1867-72.
- ✓ Fiorani, M., O. Cantoni, A. Tasinato, D. Boscoboinik, and A. Azzi. 1995. Hydrogen peroxide-and fetal bovine serum-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells: positive and negative regulation by protein kinase C isoforms. *In Biochim Biophys Acta.* Vol. 1269. 98-104.
- ✓ Folberg, R., M.J. Hendrix, and A.J. Maniotis. 2000. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol.* 156:361-81.

- ✓ Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-6.
- ✓ Foo, S.Y., and G.P. Nolan. 1999. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet.* 15:229-35.
- ✓ Fox-Robichaud, A., and P. Kubes. 2000. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology.* 31:1123-7.
- ✓ Frankel, E.N., A.L. Waterhouse and P.L. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.;* 43:519-525.
- ✓ Freemont, A.J. 1998. Demystified ... adhesion molecules. *Mol Pathol.* 51:175-84.
- ✓ Freemont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66: 663-673
- ✓ Frei, B. and J.V. Higdon. Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies.2003. *Am J Clin Nutr* ; 133: 3275S-84S.

- ✓ Futreal, P.A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman, and M.R. Stratton. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 4:177-83.
- ✓ Gabbert, H. 1985. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev*. 4:293-309.
- ✓ Gabbert, H.E., S. Meier, C.D. Gerharz, and G. Hommel. 1991. Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric-cancer patients. *Int J Cancer*. 49:203-7.
- ✓ Gal, A., and G.N. Wogan. 1996. Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:15102-7.
- ✓ Galli. F. 2007. Interactions of polyphenolic compounds with drug disposition and metabolism. *Curr Drug Metab*. 2007;8(8):830-8
- ✓ Garcia-Ruiz, C., A. Colell, M. Mari, A. Morales, and J.C. Fernandez-Checa. 1997. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 272:11369-77.
- ✓ Garofalo, A., R.G. Chirivi, C. Foglieni, R. Pigott, R. Mortarini, I. Martin-Padura, A. Anichini, A.J. Gearing, F. Sanchez-Madrid, E. Dejana, and et al. 1995. Involvement of the

very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res.* 55:414-9.

✓ Gasic, G.J. 1984. Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 3:99-114.

✓ Gaston, B., J.M. Drazen, J. Loscalzo, and J.S. Stamler. 1994. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 149:538-51.

✓ Gee, J.M., J.F. Robertson, I.O. Ellis, P. Willsher, R.A. McClelland, H.B. Hoyle, S.R. Kyme, P. Finlay, R.W. Blamey, and R.I. Nicholson. 1994. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer.* 59:619-28.

✓ Ghafourifar, P., and C. Richter. 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418:291-6.

✓ Ghafourifar, P. and A. Saavedra-Molina, 2004. Functions of mitochondrial nitric oxide synthase. Nitric oxide, cell signaling, and gene expression. (E Cadenas Ed.) Marcel Dekker Inc. San Diego,CA.

✓ Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-32.

- ✓ Gillett, C.E., and D.M. Barnes. 1998. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol.* 51:310-6.
- ✓ Giulivi, C., J.J. Poderoso, and A. Boveris. 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11038-43.
- ✓ Glinsky, V.V., G.V. Glinsky, O.V. Glinskii, V.H. Huxley, J.R. Turk, V.V. Mossine, S.L. Deutscher, K.J. Pienta, and T.P. Quinn. 2003. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 63:3805-11.
- ✓ Glockzin, S., A. von Knethen, M. Scheffner, and B. Brune. 1999. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem.* 274:19581-6.
- ✓ Godin, C., A. Caprani, J. Dufaux, and P. Flaud. 1993. Interactions between neutrophils and endothelial cells. *J Cell Sci.* 106 (Pt 2):441-51.
- ✓ Goldberg, D.M., J. Yan and G.J. Soleas, 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 36: 79-87.
- ✓ Gomez, D.E., D.F. Alonso, H. Yoshiji, and U.P. Thorgeirsson. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 74:111-22.

- ✓ Goossens, V., J. Grooten, K. De Vos, and W. Fiers. 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:8115-9.
- ✓ Goossens, V., J. Grooten, and W. Fiers. 1996. The oxidative metabolism of glutamine. A modulator of reactive oxygen intermediate-mediated cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem.* 271:192-6.
- ✓ Gopalakrishna, R., and W.B. Anderson. 1989. Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:6758-62.
- ✓ Guan, F., D. Zhang, X. Wang and J. Chen. 2007. Nitric oxide and bcl-2 mediated the apoptosis induced by nickel (II) in human T hybridoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol;* 221(1): 86-94.
- ✓ Guba, M., G. Cernaianu, G. Koehl, E.K. Geissler, K.W. Jauch, M. Anthuber, W. Falk, and M. Steinbauer. 2001. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 61:5575-9.
- ✓ Gunter, T.E., and D.R. Pfeiffer. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 258:C755-86.

- ✓ Guo, Y.J., G. Liu, X. Wang, D. Jin, M. Wu, J. Ma, and M.S. Sy. 1994. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res.* 54:422-6.
- ✓ Hague, A., M. Moorghen, D. Hicks, M. Chapman, and C. Paraskeva. 1994. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene.* 9:3367-70.
- ✓ Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*; Vol 347, No.20.
- ✓ Hakansson, A., B. Gustafsson, A. Abdiu, L. Krysender, and L. Hakansson. 2003. Bcl-2 expression in metastatic malignant melanoma. Importance for the therapeutic efficacy of biochemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 52:249-54.
- ✓ Halliwell, B., and O.I. Aruoma. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281:9-19.
- ✓ Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119:598-620.
- ✓ Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86:353-64.

- ✓ Hanigan, M.H. 1995. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis*. 16:181-5.
- ✓ Hapke, S., M. Gawaz, K. Dehne, J. Kohler, J.F. Marshall, H. Graeff, M. Schmitt, U. Reuning, and E. Lengyel. 2001. beta(3)A-integrin downregulates the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) through a PEA3/ets transcriptional silencing element in the u-PAR promoter. *Mol Cell Biol*. 21:2118-32.
- ✓ Haqqi TM, D.D. Anthony, S. Gupta, N. Ahmad, M.S. Lee, G.K. Kumar and H. Mukhta. 1999. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8):4524-9.
- ✓ Harada, H., K. Nakagawa, M. Saito, S. Kohno, S. Nagato, K. Furukawa, Y. Kumon, K. Hamada, and T. Ohnishi. 2003. Introduction of wild-type p53 enhances thrombospondin-1 expression in human glioma cells. *Cancer Lett*. 191:109-19.
- ✓ Harbour, J.W., and D.C. Dean. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 14:2393-409.
- ✓ Harbour, J.W., R.X. Luo, A. Dei Santi, A.A. Postigo, and D.C. Dean. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential

intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 98:859-69.

✓ Harborne, J.B. 1989. *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. 1989. London: Academic Press.

✓ Harley, C.B. 1994. Telomerases. *Pathol Biol (Paris)*. 42:342-5.

✓ Hart, I.R., and I.J. Fidler. 1980. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res*. 40:2281-7.

✓ Hauss, F., J. Liu, A. Michelucci, D. Cowar, E. Morga, P. Heuschling and B. Luu. 2007. Dual bioactivity of resveratrol fatty alcohols: differentiation of neural stem cells and modulation of neuroinflammation. *Bioorg Med Chem Lett*; 17(15): 4218-22.

✓ Hernandez-Barrantes, S., M. Bernardo, M. Toth, and R. Fridman. 2002. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*. 12:131-8.

✓ Herrmann W.A., C. Brossmer, C.-P. Reisinger, T. H. Riermeier, K. Ofele, M. Beller *Chem. Eur. J*. 1997, 3, 1357.

✓ Hibbs, J.B., Jr., R.R. Taintor, Z. Vavrin, and E.M. Rachlin. 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 157:87-94.

- ✓ Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman. 2002. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 94:883-93.
- ✓ Hlatky, L., C. Tsiou, P. Hahnfeldt, and C.N. Coleman. 1994. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res.* 54:6083-6.
- ✓ Hobbs, A.J., A. Higgs, and S. Moncada. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:191-220.
- ✓ Hockenbery, D.M., Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *In Cell.* Vol. 75. 241-51.
- ✓ Hoffman, R.M. 1985. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer Res.* 5:1-30.
- ✓ Holash, J., P.C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C.R. Alexander, D. Zagzag, G.D. Yancopoulos, and S.J. Wiegand. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 284:1994-8.
- ✓ Hollenberg, N.K. 2006. Organ systems dependent on nitric oxide and the potential for nitric oxide-targeted therapies

in related diseases. *J. Clin. Hypertens (Greenwich)*; 8 (12 Supp 4): 63-73.

✓ Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem.* 54:237-71.

✓ Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 15;62(24):7241-6

✓ Honn, K.V., I.M. Grossi, L.A. Fitzgerald, L.A. Umbarger, C.A. Diglio, and J.D. Taylor. 1988. Lipoxygenase products regulate IRGpIIb/IIIa receptor mediated adhesion of tumor cells to endothelial cells, subendothelial matrix and fibronectin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 189:130-5.

✓ Honn, K.V., and D.G. Tang. 1992. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 11:353-75.

✓ Hornebeck, W., H. Emonard, J.C. Monboisse, and G. Bellon. 2002. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 12:231-41.

✓ Hornebeck, W., and F.X. Maquart. 2003. Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomed Pharmacother.* 57:223-30.

- ✓ Horton, T.M., J.A. Petros, A. Heddi, J. Shoffner, A.E. Kaufman, S.D. Graham, Jr., T. Gramlich, and D.C. Wallace. 1996. Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. *In Genes Chromosomes Cancer*. Vol. 15. 95-101.
- ✓ Howitz, K.T., K.J. Bitterman, H.Y. Cohen, D.W. Lamming, S. Lavu, J.G. Wood, R.E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L.L. Zhang, B. Scherer and D.A. Sinclair. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425 (6954): 191-6.
- ✓ Hsu, C.Y., Y.P. Chan and J. Chang. 2007. Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol Res*; 40(1): 13-21.
- ✓ Hsu, I.C., R.A. Metcalf, T. Sun, J.A. Welsh, N.J. Wang, and C.C. Harris. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*. 350:427-8.
- ✓ Huang, Z. 2000. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene*. 19:6627-31.
- ✓ Hughes, D.P., and I.N. Crispe. 1995. A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med*. 182:1395-401.
- ✓ Imlay, J.A., S.M. Chin, and S. Linn. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *In Science*. Vol. 240. 640-2.

- ✓ Ioannidis, I., and H. de Groot. 1993. Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J.* 296 (Pt 2):341-5.
- ✓ Jakobisiak, M., W. Lasek, and J. Golab. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett.* 90:103-22.
- ✓ Jang, J.H., and Y.J. Surh. 2003a. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol.* 66:1371-9.
- ✓ Jang, J.H., and Y.J. Surh. 2003b. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *In Biochem Pharmacol.* Vol. 66. 1371-9.
- ✓ Jang, M., L. Cai, G.O. Udenai, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W. Beecher, H.H. Fang, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghom, R.G. Mehta, R.C. Moon and Pezzuto. 1997. *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*; 275 (5297): 218-20.
- ✓ Jang, M and J.M. Pezzuto. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. 1999. *Drugs Exp Clin Res*; 25 (2-3): 65-77.
- ✓ Jansen, B., and U. Zangemeister-Wittke. 2002. Antisense therapy for cancer--the time of truth. *Lancet Oncol.* 3:672-83.

- ✓ Jean, D., Harbison, M., McConkey, D.J., Ronai, Z., y Bar-Eli, M. (1998). Creb and its as survival factors for human melanoma cels. *J. Biol.Chem.* 273, 24884-24890.
- ✓ Jenkins, D.C., I.G. Charles, S.A. Baylis, R. Lelchuk, M.W. Radomski, and S. Moncada. 1994. Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation. *Br J Cancer.* 70:847-9.
- ✓ Jennings, R.B., and K.A. Reimer. 1981. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol.* 102:241-55.
- ✓ Jiang, S.X., Y. Sato, S. Kuwao, and T. Kameya. 1995. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol.* 177:135-8.
- ✓ Jones, T.W., H. Thor, and S. Orrenius. 1986. Cellular defense mechanisms against toxic substances. *Arch Toxicol Suppl.* 9:259-71.
- ✓ Juin, P., O. Geneste, E. Raimbaud, and J.A. Hickman. 2004. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1644:251-60.
- ✓ Kaga, S., K. Khank, M. Matsumoto and N. Maulik. 2005. Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxigenase-1 and vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Cell. Cardiol;* 39 (5): 813-22.

✓ Kane, D.J., T.A. Sarafian, R. Anton, H. Hahn, E.B. Gralla, J.S. Valentine, T. Ord, and D.E. Bredesen. 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *In Science*. Vol. 262. 1274-7.

✓ Kasai, H., P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama, and H. Tanooka. 1986. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*. 7:1849-51.

✓ Katiyar SK, Elmets CA. Green tea polyphenols antioxidants and skin photoprotection. *Int. J. Oncol* 2001; 18:1307-13.

✓ Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. 2005. The antitumor activity of flavonoids. *19(5):895-909*.

✓ Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-57.

✓ Kim, N.W., Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266:2011-5.

✓ Kim, R., K. Tanabe, Y. Uchida, M. Emi, and T. Toge. 2003. Effect of Bcl-2 antisense oligonucleotide on drug-

sensitivity in association with apoptosis in undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Mol Med.* 11:799-804.

✓ Kimura A.K., and Xiang J.H. 1986. High levels of Met-72 antigen expression: correlation with antimetastatic activity of B16 melanoma tumor cell variants. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 1247-1254.

✓ Kimura, Y. and H. Okuda. 2001. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J.Nutr;* 131(6): 1844-9.

✓ Klatt, P., E.P. Molina, M.G. De Lacoba, C.A. Padilla, E. Martinez-Galesteo, J.A. Barcena, and S. Lamas. 1999. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *Faseb J.* 13:1481-90.

✓ Klaunig, J.E., and L.M. Kamendulis. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *In Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Vol. 44. 239-67.

✓ Knickelbein, R.G., T. Seres, G. Lam, R.B. Johnston, Jr., and J.B. Warshaw. 1997. Characterization of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells. *In Am J Physiol.* Vol. 273. L1147-55.

✓ Knowles, R.G., and S. Moncada. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298 (Pt 2):249-58.

- ✓ Knudson, A.G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68:820-3.
- ✓ Koop, S., E.E. Schmidt, I.C. MacDonald, V.L. Morris, R. Khokha, M. Grattan, J. Leone, A.F. Chambers, and A.C. Groom. 1996. Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11080-4.
- ✓ Korzekwa, A.J., K. Okuda, I. Woclawek-Potocka, S. Muvakami and D.J. Skarzynski. 2006. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *J. Reprod. Dev;* 52(3): 353-61.
- ✓ Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 60:619-42.
- ✓ Kroemer, G., and J.C. Reed. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 6:513-9.
- ✓ Kuhnle, G., Spencer, J., Chorimootoo, G., Schroeter, Debnam, E.S., Srai, S.K, Rice-Evans C. and Hahn, U., 2000. Resveratrol is absorbed in the Small Intestine as Resveratrol Glucuronide. *Biochem and Biophys Res Communication* 272, 212-217.

- ✓ Lambert, J.D. and Yang C.S., 2003. Mechanisms of Cancer Prevention by tea constituents. *J. Nutr.*133: 3262S-3267S.
- ✓ Lambert, J.D., J. Hong, G. Yang, J. Liao and C.S. Yang, 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 81:284S-91S.
- ✓ Lambert JD, Sang S, Lu AY, Yang CS. 2007. Metabolism of dietary polyphenols and possible interactions with drugs. *Curr Drug Metab.* 8(5):499-507.
- ✓ Lamson DW and Brignall MS. 2000. Antioxidants and cancer, part III: quercetin; *Altern Med Rev.* 5: 196-208.
- ✓ Larsson, R., and P. Cerutti. 1988. Oxidants induce phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem.* 263:17452-8.
- ✓ Larsson, R., and P. Cerutti. 1989. Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res.* 49:5627-32.
- ✓ Lash, L.H., and M.W. Anders. 1987. Mechanism of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine- and S-(1,2-dichlorovinyl)-L-homocysteine-induced renal mitochondrial toxicity. *Mol Pharmacol.* 32:549-56.

- ✓ Lasky, L.A. 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*. 258:964-9.
- ✓ Lasso de la Vega, M.C., P. Terradez, E. Obrador, J. Navarro, J.A. Pellicer, and J.M. Estrela. 1994. Inhibition of cancer growth and selective glutathione depletion in Ehrlich tumour cells in vivo by extracellular ATP. *Biochem J*. 298 (Pt 1):99-105.
- ✓ Laval, F., and D.A. Wink. 1994. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis*. 15:443-7.
- ✓ Lawrence, R.A., and R.F. Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 71:952-8.
- ✓ Lazo, P.A. 1981. Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur J Biochem*. 117:19-25.
- ✓ Lee, M., D.H. Hyun, K.A. Marshall, L.M. Ellerby, D.E. Bredesen, P. Jenner, and B. Halliwell. 2001. Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *In Free Radic Biol Med*. Vol. 31. 1550-9.
- ✓ Legha, S.S. 1997. Durable complete responses in metastatic melanoma treated with interleukin-2 in combination

with interferon alpha and chemotherapy. *Semin Oncol.* 24:S39-43.

✓ Leist, M., F. Gantner, S. Jilg, and A. Wendel. 1995. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. *J Immunol.* 154:1307-16.

✓ Leist, M., and M. Jaattela. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:589-98.

✓ Lezoualc'h, F., Y. Sagara, F. Holsboer, and C. Behl. 1998. High constitutive NF-kappaB activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *J Neurosci.* 18:3224-32.

✓ Li, H., Z.M. Marshall, and A.R. Whorton. 1999. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *In Am J Physiol.* Vol. 276. C803-11.

✓ Li, L.M., R.G. Kilbourn, J. Adams, and I.J. Fidler. 1991a. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* 51:2531-5.

✓ Li, L.M., G.L. Nicolson, and I.J. Fidler. 1991b. Direct in vitro lysis of metastatic tumor cells by cytokine-activated murine vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 51:245-54.

- ✓ Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412:95-9.
- ✓ Li, P., H. Allen, S. Banerjee, S. Franklin, L. Herzog, C. Johnston, J. McDowell, M. Paskind, L. Rodman, J. Salfeld, and et al. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 80:401-11.
- ✓ Liebermann, D.A., B. Hoffman, and R.A. Steinman. 1995. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene*. 11:199-210.
- ✓ Liotta, L.A., J. Kleinerman, and G.M. Saidel. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*. 34:997-1004.
- ✓ Liotta, L.A., and E.C. Kohn. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 411:375-9.
- ✓ Liotta, L.A., C.N. Rao, and S.H. Barsky. 1983. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*. 49:636-49.
- ✓ Liotta, L.A., G.M. Saidel, and J. Kleinerman. 1976a. Stochastic model of metastases formation. *Biometrics*. 32:535-50.

✓ Liotta, L.A., M.G. Sidel, and J. Kleinerman. 1976b. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res.* 36:889-94.

✓ Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 64:327-36.

✓ Liston, P., W.G. Fong, and R.G. Korneluk. 2003. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene.* 22:8568-80.

✓ Liu, R.H., and J.H. Hotchkiss. 1995. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res.* 339:73-89.

✓ Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147-57.

✓ Lo, Y.Y., and T.F. Cruz. 1995. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem.* 270:11727-30.

✓ Loeb, L.A. 1985. Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell.* 40:483-4.

- ✓ Loschen, G., A. Azzi, C. Richter, and L. Flohe. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42:68-72.
- ✓ Lugassy, C., H.K. Kleinman, J.A. Engbring, D.R. Welch, J.F. Harms, R. Rufner, G. Ghanem, S.R. Patierno, and R.L. Barnhill. 2004. Pericyte-like location of GFP-tagged melanoma cells: ex vivo and in vivo studies of extravascular migratory metastasis. *Am J Pathol.* 164:1191-8.
- ✓ Lui Y, Kulesz-Martin M: TP53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence specific DNA binding. *Carcinogenesis* 22:852, 2001.
- ✓ Lundblad, V., and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell.* 57:633-43.
- ✓ Luzzi, K.J., I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers, and A.C. Groom. 1998. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 153:865-73.
- ✓ Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N.R. Hackett, R.G. Crystal, M.A. Moore, K.A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra, and S. Rafii. 2001. Impaired

recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 7:1194-201.

✓ MacDonald, I.C., A.C. Groom, and A.F. Chambers. 2002. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays.* 24:885-93.

✓ Mackay, C.R., and B.A. Imhof. 1993. Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today.* 14:99-102.

✓ Macleod, K. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 10:81-93.

✓ Malinshi, T. 2007. Nitric oxidative and nitrosative stress in Alzheimer's disease. *J.Alzheimers Dis.;* 11(2): 207-18. Review.

✓ Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert and C. Rémésy, 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Rev of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr;* 81: 230S-42S.

✓ Manickam, M., M.Ramathan, M.A.Jahroni, J.P.Ghansouria and A.B. Ray. *J. Nat. Prod.*1997.

✓ Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P. and Ducharme, M.P., 2002. Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats: Exent of Absortion, Glucuronidation, and

Enterohepatic Recirculation Evidence by a Linked-Rat Model. *JPET*, 302; 369-373, 2002.

✓ Marletta, M.A. 1988. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol.* 1:249-57.

✓ Marlin, S.D., and T.A. Springer. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 51:813-9.

✓ Martin-Padura, I., R. Mortarini, D. Lauri, S. Bernasconi, F. Sanchez-Madrid, G. Parmiani, A. Mantovani, A. Anichini, and E. Dejana. 1991. Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res.* 51:2239-41.

✓ Marui, N., M.K. Offermann, R. Swerlick, C. Kunsch, C.A. Rosen, M. Ahmad, R.W. Alexander, and R.M. Medford. 1993. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 92:1866-74.

✓ Mayer, B., and B. Hemmens. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 22:477-81.

- ✓ McDonnell, T.J., P. Troncoso, S.M. Brisbay, C. Logothetis, L.W. Chung, J.T. Hsieh, S.M. Tu, and M.L. Campbell. 1992. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52:6940-4.
- ✓ Meier, P., A. Finch, and G. Evan. 2000. Apoptosis in development. *Nature.* 407:796-801.
- ✓ Meister, A., and M.E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52:711-60.
- ✓ Melino, G., F. Bernassola, R.A. Knight, M.T. Corasaniti, G. Nistico, and A. Finazzi-Agro. 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 388:432-3.
- ✓ Menkes, M.S., G.W. Comstock, J.P. Vuilleumier, K.J. Helsing, A.A. Rider, and R. Brookmeyer. 1986. Serum beta-carotene, vitamins A and E, selenium, and the risk of lung cancer. *N Engl J Med.* 315:1250-4.
- ✓ Merad-Saidoune, M., E. Boitier, A. Nicole, C. Marsac, J.C. Martinou, B. Sola, P.M. Sinet, and I. Ceballos-Picot. 1999. Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl-2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced by glutathione depletion. *In Exp Neurol.* Vol. 158. 428-36.
- ✓ Michel, T., and O. Feron. 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 100:2146-52.

- ✓ Mignatti, P., and D.B. Rifkin. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73:161-95.
- ✓ Miles, A.M., M.W. Owens, S. Milligan, G.G. Johnson, J.Z. Fields, T.S. Ing, V. Kottapalli, A. Keshavarzian, and M.B. Grisham. 1995. Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol.* 58:616-22.
- ✓ Monaghan, P., D. Robertson, T.A. Amos, M.J. Dyer, D.Y. Mason, and M.F. Greaves. 1992. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem.* 40:1819-25.
- ✓ Moncada, S. 1997. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* 811:60-7; discussion 67-9.
- ✓ Moncada, S., and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329:2002-12.
- ✓ Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:261-91.
- ✓ Morikawa, S., P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R.K. Jain, and D.M. McDonald. 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 160:985-1000.

- ✓ Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, and S.W. Fesik. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 381:335-41.
- ✓ Nair, V.D., T. Yuen, C.W. Olanow, and S.C. Sealfon. 2004. Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. *In J Biol Chem*. Vol. 279. 27494-501.
- ✓ Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*. 6:3051-64.
- ✓ Neuhouser M.L., 2004. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*. 50(1):1-7.
- ✓ Nevins J.R., The RB/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10: 851, 2001.
- ✓ Nguyen, T., D. Brunson, C.L. Crespi, B.W. Penman, J.S. Wishnok, and S.R. Tannenbaum. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:3030-4.
- ✓ Nicolson, G.L. 1988. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev*. 7:143-88.

- ✓ Nicotera, P., and G. Melino. 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*. 23:2757-65.
- ✓ Nonomura, S., H. Kanawaga and A. Makimoto. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants. i. studies on the components of ko-j o-kon. (*Polygonum Cuspidatum sieb. et zucc.*). *Yakugazu Zasshi*. 83:988-90.
- ✓ Ochoa, S. 1983. Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes. *Arch Biochem Biophys*. 223:325-49.
- ✓ Ohff, M., A. Ohff, D. Milstein, Chem. Commun., 1999, 357.
- ✓ Ohigashi H., K. Shinkai, M. Mukai, O. Ishikawa, S. Imaoka, T. Iwanaga and H. Akedo. 1989. In vitro invasion of endothelium cell monolayer by rat ascites hepatoma cells. *Jpn J. Cancer Res*. 80, 818-821.
- ✓ Ohshima, H., and H. Bartsch. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*. 305:253-64.
- ✓ Oka, S., H. Kamata, K. Kamata, H. Yagisawa, and H. Hirata. 2000. N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB kinases. *FEBS Lett*. 472:196-202.
- ✓ Okahara, H., H. Yagita, K. Miyake, and K. Okumura. 1994. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and

vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res.* 54:3233-6.

✓ O'Reilly, M.S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen, and J. Folkman. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 88:277-85.

✓ O'Reilly, M.S., L. Holmgren, C. Chen, and J. Folkman. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med.* 2:689-92.

✓ O'Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, M. Moses, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage, and J. Folkman. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 79:315-28.

✓ Orosz, P., A. Kruger, M. Hubbe, J. Ruschoff, P. Von Hoegen, and D.N. Mannel. 1995. Promotion of experimental liver metastasis by tumor necrosis factor. *Int J Cancer.* 60:867-71.

✓ Orr, F.W., H.H. Wang, R.M. Lafrenie, S. Scherbarth, and D.M. Nance. 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol.* 190:310-29.

✓ Orsotic, N., A.H. Knezevic, L. Sver, S. Terzic and I. Basic. 2004. Immunomodulation and antimetastatic action of

propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol*; 94 (2-3): 307-15.

✓ Ortega A.L., Carretero J., Esteve J.M., Gambini J., Asensi M., Rodilla V. and Estrela J.M. 2003a. Tumor cytotoxicity by endothelial cells. Impairment of the mitochondrial system for glutathione uptake in mouse B16 melanoma cells that survive after in vitro interaction with the hepatic sinusoidal endothelium. *J. Biol. Chem* 278, 13888-13897.

✓ Ortega A., Ferrer P., Carretero J., Obrador E., Asensi M., Pellicer J.A., and Estrela J.M. 2003b. Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* 278, 39591-39599.

✓ Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso, and R. Lobb. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 59:1203-11.

✓ Pacelli, R., D.A. Wink, J.A. Cook, M.C. Krishna, W. DeGraff, N. Friedman, M. Tsokos, A. Samuni, and J.B. Mitchell. 1995. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J Exp Med*. 182:1469-79.

✓ Pacher, P., and G. Hajnoczky. 2001. Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *Embo J*. 20:4107-21.

- ✓ Pan, M.H., Y.H. Chang, V. Badmaev, K. Nagabhushaman, C.T. Ho. 2007. Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. *J. Agric. Food. Chem*; 55(19): 7777-85.
- ✓ Panfili, E., G. Sandri, and L. Ernster. 1991. Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.* 290:35-7..
- ✓ Papetti, M., and I.M. Herman. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C947-70.
- ✓ Pardee, A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 246:603-8.
- ✓ Paris, R., A. Morales, O. Coll, A. Sanchez-Reyes, C. Garcia-Ruiz, and J.C. Fernandez-Checa. 2002. Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. *In J Biol Chem.* Vol. 277. 49870-6.
- ✓ Pauli, B.U., H.G. Augustin-Voss, M.E. el-Sabban, R.C. Johnson, and D.A. Hammer. 1990. Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev.* 9:175-89.
- ✓ Pauli, B.U., and C.L. Lee. 1988. Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab Invest.* 58:379-87.

- ✓ Peach, R.J., D. Hollenbaugh, I. Stamenkovic, and A. Aruffo. 1993. Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. *J Cell Biol.* 122:257-64.
- ✓ Pearce, L.L., M.W. Epperly, J.S. Greenberger, B.R. Pitt, and J. Peterson. 2001. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide.* 5:128-36.
- ✓ Pechanova, O., R. Rezzani, P. Babal, I. Bernatova and R. Andriantsitohaina. 2006. Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney. 55 Suppl 1: 517-36. Review
- ✓ Penumathsa S.V., M. Thirunawkkarasu, S. Koneru, B. Juhasz, L. Zhan, R. Pant, V.P. Menon, H. Otani and Maulik. 2007. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.*; 43(5): 720-9.
- ✓ Perez-Ortiz, L., T. Zaldivar-Vaillant, and J.D. Tamayo-Suarez. 2000. Malignant gliomas. Oncogenic considerations. *Rev Neurol.* 31:49-52.
- ✓ Pervaiz, S., Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. 2003. *The FASEB*, 17; 1975-1985.
- ✓ Polsky, D., and C. Cordon-Cardo. 2003. Oncogenes in melanoma. *Oncogene.* 22:3087-91.

- ✓ Pommer. 1977. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16, 423-429.
- ✓ Pommer and Thieme. 1983. *Top Current Chem.* 109, 165-188.
- ✓ Pryor, W.A., and G.L. Squadrito. 1995. The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 268:L699-722.
- ✓ Quaranta, V., 2000. Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way. *J Cell Biol.* 149:1167-70.
- ✓ Quiney C, Dauzonne D, Kern C, Fourneron JD, Izard JC, Mohammad RM, Kolb JP, Billard C. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk Res.*; 28(8):851-61
- ✓ Radomski, M.W., D.C. Jenkins, L. Holmes, and S. Moncada. 1991. Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res.* 51:6073-8.
- ✓ Raha, S., A.T. Myint, L. Johnstone, and B.H. Robinson. 2002. Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase. *Free Radic Biol Med.* 32:421-30.

- ✓ Rak, J., and J.L. Yu. 2004. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Semin Cancer Biol.* 14:93-104.
- ✓ Raud, J., and L. Lindbom. 1993. Leukocyte rolling and firm adhesion in the microcirculation. *Gastroenterology.* 104:310-4.
- ✓ Reed, J.C., S. Kitada, S. Takayama, and T. Miyashita. 1994. Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann Oncol.* 5 Suppl 1:61-5.
- ✓ Remsberg, C.M., Yañez J.A., Y. Ohgami, K.R. Vega-Villa, A.M. Rimando and N.M. Davies. 2007. Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res;*
- ✓ Revesz, L., M.R. Edgren, and A.A. Wainson. 1994. Selective toxicity of buthionine sulfoximine (BSO) to melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 29:403-6.
- ✓ Rice, G.E., and M.P. Bevilacqua. 1989. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 246:1303-6.
- ✓ Rice, G.E., M.A. Gimbrone, Jr., and M.P. Bevilacqua. 1988. Tumor cell-endothelial interactions. Increased adhesion

of human melanoma cells to activated vascular endothelium. *Am J Pathol.* 133:204-10.

✓ Rich, T., R.L. Allen, and A.H. Wyllie. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature.* 407:777-83.

✓ Riggins, J.N., and L.J. Marnett. 2001. Mutagenicity of the malondialdehyde oligomerization products 2-(3'-oxo-1'-propenyl)-malondialdehyde and 2,4-dihydroxymethylene-3-(2,2-dimethoxyethyl)glutaraldehyde in *Salmonella*. *In Mutat Res.* Vol. 497. 153-7.

✓ Rimando, A.M., R.Magmani, D.R.Feller and W.Yokoyama, 2005. Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem.* 53(9):3403-7.

✓ Rimando, A.M., M. Cuendet, C.Desmarchelier, R.G. Mehta, J.M. Pezzuto and S.O. Duke, 2002. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 50: 3453-7.

✓ Rishi, L., R. Dhiman, M. Raje and S. Majumdar. 2007. Nitric oxide induces apoptosis in cutaneous T cell lymphoma (HUT-78) by downregulating constitutive NF-Kappa B. *Biochim. Biophys. Acta.;* 1770(8): 1230-9.

- ✓ Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262:744-7.
- ✓ Rodrigo, J., D. Alonso, A. Fernandez, J. Serrano, and J. Lopez. 2000. Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity. *An Sist Sanit Navar*. 23:195-235.
- ✓ Ross, J.A. and C.M. Kasum, 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic affects and safety; *Annu Rev Nutr*. 22: 19-34.
- ✓ Sage E.H., Regulation of vascular morphogenesis by SPARC. *Kidney Int*.51:1383, 1997.
- ✓ Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391:96-9.
- ✓ Sauter, E.R., U.C. Yeo, A. von Stemm, W. Zhu, S. Litwin, D.S. Tichansky, G. Pistritto, M. Nesbit, D. Pinkel, M. Herlyn, and B.C. Bastian. 2002. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res*. 62:3200-6.
- ✓ Schabel, F.M., Jr. 1975. Concepts for systemic treatment of micrometastases. *Cancer*. 35:15-24.

✓ Schanne, F.A., A.B. Kane, E.E. Young, and J.L. Farber. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 206:700-2.

✓ Schreck, R., B. Meier, D.N. Mannel, W. Droge, and P.A. Baeuerle. 1992. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med*. 175:1181-94.

✓ Schweichel, J.U., and H.J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 7:253-66.

✓ Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 300:135-9.

✓ Seghezzi, G., R. Marelli, S.J. Mandriota, M.L. Nolli, R. Mazziere, and P. Mignatti. 1996. Tumor cell-conditioned medium stimulates expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*. 169:300-8.

✓ Seiki, M. 2002. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol*. 14:624-32.

✓ Seiki, M., N. Koshikawa, and I. Yana. 2003. Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix

metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 22:129-43.

✓ Sheseley, E.G, Maeda, N., Kim, H., Desai, K., Krege, J.H., Laumbach, V.E., Sherman, P.A., Seesa, W.C. y Smithies, O. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13176-13181.

✓ Shoji, Y., Y. Uedono, H. Ishikura, N. Takeyama, and T. Tanaka. 1995. DNA damage induced by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. *Immunology.* 84:543-8.

✓ Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91:31S-38S.

✓ Signorelli, P. and Ghidoni R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J. Nutr. Biochem.* 16(8): 449-66.

✓ Slater, A.F., C.S. Nobel, and S. Orrenius. 1995a. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *In Biochim Biophys Acta.* Vol. 1271. 59-62.

✓ Slater, A.F., C. Stefan, I. Nobel, D.J. van den Dobbelen, and S. Orrenius. 1995b. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *In Toxicol Lett.* Vol. 82-83. 149-53.

✓ Soeda, S., K.Iwata, Y. Hosoda, H. Simeno. 2001 Daunorubicin attenuates tumor necrosis factor-alpha-

induced biosynthesis of plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1538 (2-3):234-41.

✓ Soengas, M.S., and S.W. Lowe. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 22:3138-51.

✓ Staal-van den Brekel, A.J., M.A. Dentener, A.M. Schols, W.A. Buurman, and E.F. Wouters. 1995. Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 13:2600-5.

✓ Steinman, H.M. 1995. The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *In J Biol Chem.* Vol. 270. 3487-90.

✓ Stewart, V.C., M.A. Sharpe, J.B. Clark, and S.J. Heales. 2000. Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain. *J Neurochem.* 75:694-700.

✓ Stoolman, L.M. 1989. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell.* 56:907-10.

✓ Stracke, M.L., H.C. Krutzsch, E.J. Unsworth, A. Arestad, V. Cioce, E. Schiffmann, and L.A. Liotta. 1992. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem.* 267:2524-9.

✓ Sturm, J.W., R. Magdeburg, K. Berger, B. Petruch, S. Samel, R. Bonninghoff, M. Keese, M. Hafner, and S. Post. 2003. Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model. *Int J Cancer*. 107:11-21.

✓ Sugarbaker, E.V., and A.S. Ketcham. 1977. Mechanisms and prevention of cancer dissemination: an overview. *Semin Oncol*. 4:19-32.

✓ Sugarman, B.J., B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino, Jr., and H.M. Shepard. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*. 230:943-5.

✓ Sugino, T., T. Kusakabe, N. Hoshi, T. Yamaguchi, T. Kawaguchi, S. Goodison, M. Sekimata, Y. Homma, and T. Suzuki. 2002. An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am J Pathol*. 160:1973-80.

✓ Sugino, T., T. Yamaguchi, G. Ogura, A. Saito, T. Hashimoto, N. Hoshi, S. Yoshida, S. Goodison, and T. Suzuki. 2004. Morphological evidence for an invasion-independent metastasis pathway exists in multiple human cancers. *BMC Med*. 2:9.

✓ Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M.C. Prevost, P.M. Alzari, and G.

Kroemer. 1999a. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 189:381-94.

✓ Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, and G. Kroemer. 1999b. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397:441-6.

✓ Szalai, G., R. Krishnamurthy, and G. Hajnoczky. 1999. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo J.* 18:6349-61.

✓ Takahashi, T., M.M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, and J.D. Minna. 1989. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science.* 246:491-4.

✓ Takaoka, A., M. Adachi, H. Okuda, S. Sato, A. Yawata, Y. Hinoda, S. Takayama, J.C. Reed, and K. Imai. 1997. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene.* 14:2971-7.

✓ Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251:1451-5.

✓ Tamura, G., S. Nishizuka, C. Maesawa, Y. Suzuki, T. Iwaya, K. Sakata, Y. Endoh, and T. Motoyama. 1999. Mutations

in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. *In Eur J Cancer*. Vol. 35. 316-9.

✓ Tanabe, K., R. Kim, H. Inoue, M. Emi, Y. Uchida, and T. Toge. 2003. Antisense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol*. 22:875-81.

✓ Tang, D.G., C.A. Diglio, and K.V. Honn. 1994. Activation of microvascular endothelium by eicosanoid 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid leads to enhanced tumor cell adhesion via up-regulation of surface expression of alpha v beta 3 integrin: a posttranscriptional, protein kinase C- and cytoskeleton-dependent process. *Cancer Res*. 54:1119-29.

✓ Tartaglia, L.A., D. Pennica, and D.V. Goeddel. 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*. 268:18542-8.

✓ Tatoyan, A., and C. Giulivi. 1998. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 273:11044-8.

✓ Terradez, P., M. Asensi, M.C. Lasso de la Vega, I.R. Puertes, J. Vina, and J.M. Estrela. 1993. Depletion of tumour glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem J*. 292 (Pt 2):477-83.

- ✓ Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *In Science*. Vol. 267. 1456-62.
- ✓ Tomlinson, F.H., B.W. Scheithauer, C.J. Hayostek, J.E. Parisi, F.B. Meyer, E.G. Shaw, T.L. Weiland, J.A. Katzmann, and C.R. Jack, Jr. 1994. The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *J Child Neurol*. 9:301-10.
- ✓ Tonks, N.K. 1993. Introduction: protein tyrosine phosphatases. *Semin Cell Biol*. 4:373-7.
- ✓ Tran-Thang, C., E. Kruithof, H. Lahm, W.A. Schuster, M. Tada, and B. Sordat. 1996. Modulation of the plasminogen activation system by inflammatory cytokines in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer*. 74:846-52.
- ✓ Trump, B.F., I.K. Berezesky, T. Sato, K.U. Laiho, P.C. Phelps, and N. DeClaris. 1984. Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect*. 57:281-7.
- ✓ Trump, B.F., and R.E. Bulger. 1967. Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage. *Lab Invest*. 16:453-82.
- ✓ Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of

neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 226:1097-9.

✓ Vercammen, D., R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. Van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers, and P. Vandenabeele. 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 187:1477-85.

✓ Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43-53.

✓ Verheul, H.M., E.E. Voest, and R.O. Schlingemann. 2004. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol*. 202:5-13.

✓ Vidal-Vanaclocha, F., M. Rocha, A. Asumendi, E. Barberá-Guillem. 1993. Isolation and enrichment of two sublobular compartment-specific endothelial cell subpopulations from liver sinusoids. *Hepatology*. 18(2):328-39.

✓ Vitaglione, P., Sforza, S., Galaverna, G., Ghidini, C., Caporaso, P., Fogliano, V. And Marchelli, R., 2005. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol. Nutr. Food Res*, 49; 495-504.

- ✓ Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66:107-19.
- ✓ Voehringer, D.W., and R.E. Meyn. 2000. Redox aspects of Bcl-2 function. *In Antioxid Redox Signal*. Vol. 2. 537-50.
- ✓ Walker, N.I., B.V. Harmon, G.C. Gobe, and J.F. Kerr. 1988. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. 13:18-54.
- ✓ Wallach, D. 1997. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem Sci*. 22:107-9.
- ✓ Walle T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biol. Chem.*; 393(2): 281-9.
- ✓ Wang, B., Q. Xiong, Q. Shi, X. Le, and K. Xie. 2001. Genetic disruption of host interferon-gamma drastically enhances the metastasis of pancreatic adenocarcinoma through impaired expression of inducible nitric oxide synthase. *Oncogene*. 20:6930-7.
- ✓ Wang, H.H., A.R. McIntosh, B.B. Hasinoff, E.S. Rector, N. Ahmed, D.M. Nance, and F.W. Orr. 2000. B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis. *Cancer Res*. 60:5862-9.

- ✓ Wang, L-X, Heredia A., Song, H., Zhang, Z., Yu, B., Davis, C. and Redfield, R., 2004. Resveratrol Glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Chareterization, Synthesis, and anti-HIV activity. *Journal of Phar. Science*, 93; 2448-2457.
- ✓ Wang, S., M. Miura, YK Jung, H. Zhu, E. Li, and J. Yuan. 1998. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*. 92:501-9.
- ✓ Ware, C.F., S. Van Arsdale, and T.L. VanArsdale. 1996. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem*. 60:47-55.
- ✓ Wayner, D.D., G.W.Burton and K.U.Ingold. 1986. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim Biophys Acta*. 884:119-23.
- ✓ Weisburger, J.H. 1999 Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med*. 220:271-5
- ✓ Weisiger, R.A. and I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*. 248:3582-92.
- ✓ Weiss, L. 1990. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*. 54:159-211.
- ✓ Weiss, L. 2000. Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev*. 19:I-XI, 193-383.

- ✓ Weiss, L., D.S. Dimitrov, and M. Angelova. 1985. The hemodynamic destruction of intravascular cancer cells in relation to myocardial metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5737-41.
- ✓ Wenzel, E. and Somoza, V., 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 49,472-481
- ✓ Wernert, N. 1997. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch.* 430:433-43.
- ✓ Whitcombe, N., K. K. Hii and S.E.Gibson. 2001. Advances in the Heck chemistry of aryl bromides and chlorides. *Tetrahedron* 57, 7449-7476.
- ✓ Williamson, G. and C.Manach, 2005. Bioavailability y bioefficacy of polyphenols in humans II. Rev of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81(suppl):243S-55S.
- ✓ Wink, D.A., M.B. Grisham, J.B. Mitchell, and P.C. Ford. 1996. Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol.* 268:12-31.
- ✓ Wink, D.A., K.S. Kasprzak, C.M. Maragos, R.K. Elespuru, M. Misra, T.M. Dunams, T.A. Cebula, W.H. Koch, A.W. Andrews, J.S. Allen, and et al. 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* 254:1001-3.

- ✓ Wink, D.A., and J.B. Mitchell. 2003. Nitric oxide and cancer: an introduction. *Free Radic Biol Med.* 34:951-4.
- ✓ Wink, D.A., Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M.W. Dewhirst, and J.B. Mitchell. 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis.* 19:711-21.
- ✓ Wong, C.W., A. Lee, L. Shientag, J. Yu, Y. Dong, G. Kao, A.B. Al-Mehdi, E.J. Bernhard, and R.J. Muschel. 2001. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 61:333-8.
- ✓ Woodhouse, E.C., R.F. Chuaqui, and L.A. Liotta. 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer.* 80:1529-37.
- ✓ Wyllie, A.H., G.J. Beattie, and A.D. Hargreaves. 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 13:681-92.
- ✓ Xanthoudakis, S., and T. Curran. 1992. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo J.* 11:653-65.
- ✓ Xie, K., and I.J. Fidler. 1998. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. *Cancer Metastasis Rev.* 17:55-75.
- ✓ Xie, K., and S. Huang. 2003. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med.* 34:969-86.

- ✓ Xu, W., L.Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, and I.G. Charles. 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res.* 12:311-20.
- ✓ Xu, Y., and W.A. See. 1994. Regulation of plasminogen activator activity in transitional carcinoma cell lines by wound site growth factors. *Surg Oncol.* 3:175-85.
- ✓ Xu, Y., C.T. Ho, S.G.Amin, C.Han and F.L.Chung, 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52:3875-9.
- ✓ Yamamoto, T., N. Terada, Y. Nishizawa, H. Tanaka, H. Akedo, A. Seiyama, T. Shiga, and H. Kosaka. 1994. Effects of NG-nitro-L-arginine and/or L-arginine on experimental pulmonary metastasis in mice. *Cancer Lett.* 87:115-20.
- ✓ Yamamoto, T., N. Terada, A. Seiyama, Y. Nishizawa, H. Akedo, and H. Kosaka. 1998. Increase in experimental pulmonary metastasis in mice by L-arginine under inhibition of nitric oxide production by NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Int J Cancer.* 75:140-4.
- ✓ Yamasaki, L., T. Jacks, R. Bronson, E. Goillot, E. Harlow, and N.J. Dyson. 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell.* 85:537-48.

- ✓ Yang, CS., J.M.Landau, M-T Huang. and H.L. Newmark, 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*21: 381-406.
- ✓ Yang, C.S., P.Maliakal and X.Meng. Inhibition in carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42:25-54.
- ✓ Yebra, M., G.C. Parry, S. Stromblad, N. Mackman, S. Rosenberg, B.M. Mueller, and D.A. Cheresh. 1996. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. *J Biol Chem.* 271:29393-9.
- ✓ Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:139-62.
- ✓ Yuan, J., and B.A. Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 407:802-9.
- ✓ Zastawny, T.H., M. Dabrowska, T. Jaskolski, M. Klimarczyk, L. Kulinski, A. Koszela, M. Szczesniewicz, M. Sliwinska, P. Witkowski, and R. Olinski. 1998. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *In Free Radic Biol Med.* Vol. 24. 722-5.
- ✓ Zehavi-Willner, T. 1973. The possible role of glutathione in protein biosynthesis. *Isr J Med Sci.* 9:129-35.

- ✓ Zornig, M., A. Hueber, W. Baum, and G. Evan. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1551:F1-37

ABREVIATURAS

AIF	Factor inductor de apoptosis
AMG	Aminoguanidina
AP-1	Proteína activadora 1
Apaf	Factor de activación de la apoptosis
B16M	Células de melanoma B16
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-6-carboxifluoresceína-acetoximetiléster
BSO	Butionina sulfoximina
Cadherina-E	Cadherina epitelial
Claceína-AM	Calceína-acetometiléster
CAM	Molécula de adhesión celular
CAT	Catalasa
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDK	Kinasa dependiente de ciclina
CO₂	Dióxido de carbono

CREB	cAMP response element-binding
CREB-P	CREB fosforilado
CytGSH	GSH citosólico
DEM	Dietilmaleato
DFF45	Factor 45 de fragmentación de DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
G6PDH	Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSE	Endotelio sinusoidal hepático

IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
iB16M	B16M invasivas
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
IκB	Inhibidores NF- κ B
IL	Interleuquina
i.v.	Intravenosa
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun
L\cdot	Radical ácido graso
LDB16M	B16M a baja densidad celular
LOO\cdot	Peróxido de ácido graso
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MRP	Proteína asociada a la resistencia a multidroga
MS/MS	Espectrometría de masas de triple cuadrupolo
mtDNA	DNA mitocondrial
mtGSH	GSHmitocondrial

N-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
N-SMasa	Esfingomielinasa neutra
NADP⁺	Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato
NADPH	NADP reducido
NF-κB	Factor nuclear Kappa-B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O₂	Oxígeno
O₂^{·-}	Anión superóxido
·OONO	Peroxinitrito
·OH	Radical hidroxilo
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PBS	Tampón fosfato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKC	Proteín quinasa C
pRB	Producto del gen del retinoblastoma
PTPC	Complejo del poro de transición de permeabilidad
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
QUER	Quercetina
RNA	Ácido ribonucleico

RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SBF	Suero Bovino fetal
SNAP	S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamida
SOD	Superóxido dismutasa
<i>t</i>-PTER	<i>trans</i> -Pterostilbeno
<i>t</i>-RESV	<i>trans</i> -Resveratrol
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-R	Receptores de membrana del TNF
tPA	Activador tisular del plasminógeno
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
uPAR	Receptor de la uPA
VCAM	Moléculas de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VLA	Antígeno de expresión muy tardía
γ-GCS	γ -glutamil cisteína sintetasa
γ-GT	γ -glutamil transpeptidasa
8-OH-Gua	8-hidroxiguanosina
