

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

DEPLECIÓN DE GSH Y BCL-2 EN CÉLULAS DE
MELANOMA MALIGNO B16: MECANISMOS DE
SENSIBILIZACIÓN FRENTE AL ESTRÉS
OXIDATIVO/NITROSATIVO Y LA QUIMIOTERAPIA

MARÍA BENLLOCH GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 31 de Gener de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Luis Franco Vera
- D. Juan Francisco Llopis Borrás
- D. Esteban Ballestar Tarín
- D. Erwin Knecht Roberto
- D. Miguel Ángel Asensi Miralles

Va ser dirigida per:

D. José Estrela Arigüel

D. Ángel Ortega Valero

©Copyright: Servei de Publicacions
María Benlloch García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7079-7

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

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

Facultad de Medicina y odontología

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



Depleción de GSH y Bcl-2 en células de melanoma maligno B16: mecanismos de sensibilización frente al estrés oxidativo/nitrosativo y la quimioterapia.

**TESIS DOCTORAL presentada por Dña.
MARÍA BENLLOCH GARCÍA**

Valencia, 2007

*A mi familia;
siempre estaremos juntos.*

Al Dr. *José M^a Estrela Arigüel*, que me brindó la oportunidad de entrar en su grupo de investigación y ha sido un excelente maestro.

Al Dr. *Ángel Ortega*, por su paciencia, su tesón en el laboratorio, por ser un gran investigador (con mucho futuro) que me ha ayudado en todo lo que necesitaba y, por encima de todo, por ser un buen compañero (y amigo). Me gustaría en un futuro poder trabajar con él (y disfrutar de muchos conciertos locos de heavy metal).

A la Dra. *Elena Obrador* compañera en todas las intervenciones quirúrgicas murinas. Al Dr. *Julián Carretero* por ayudarme en los numerosos problemas de biología molecular que me he encontrado y por su paciencia docente.

Al Dr. *Miguel Asensi*, al que, a parte de tener paciencia con el HPLC, la ha tenido en muchos momentos conmigo. A *Sonia Priego* por sonreír siempre, incluso en los momentos difíciles en el laboratorio y dar buenos consejos cuando se necesitan. A *Paula Ferrer*, la suministradora de polifenoles sintéticos más rápida del mundo, por su alegría con la que nos hace empezar de buen humor el día en Farmacia. A *Salva Mena*, el compañero por excelencia, cuya paciencia y entrega en el trabajo no tiene precio, por ser un buen compañero (y oyente).

A los Dres. *José Viña, Federico Pallardó, Juan Sastre, Antonio Alberola, Luis Such, Javier Miranda* y al resto de profesores del departamento por su trato amistoso, cordial y haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

A *Asun* por su aprecio, simpatía y esmero en su trabajo. A *Consuelo* por su simpatía y por el trabajo realizado. A *Inma*, por poner orden en el caos del laboratorio. A *Eva, Elena Caveró, Elena Plano* por su inagotable paciencia ante mi torpeza con el papeleo y a los nuevos, *Chencho y Mari*. A *Inma Noguera* por sus pacientes lecciones anatómicas murinas y prestar ayuda siempre que la manipulación de los animalicos se hacía complicada.

A *Luisa, M^a Carmen, Rocío, Vanesa, Paco, Silvia* y el resto del personal de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina por su ayuda y amabilidad. A *Ana Flores*, por ayudarme en

cultivos, dominar al rebelde del MoFlo, y ser buena amiga (y compañera de congresillos).

A *Jelena y Ana Lloret* (las mamis), Nancy, con la que comparto amistad y illaves!, a *Juan Gambini* (que a veces es un sol, pero otras ilo mataría!), quien nos ha endulzado muchos momentos en el laboratorio (con la comida de sus amigas las Drosophilas) y a su "tropa" de paellas: *Javier Escobar, Raúl* (radiactivo man) y *Rubén* (vecino, buen amigo y bellísima persona); a *Alexandro* sei un grandissimo e pazzo amico, grazie per tutti i consigli e tutte le birre che abbiamo presso insieme. Al deporte's team (o western team): *Lele, Marco, Vladi* y, la jefa, *M^aCarmen* (por ser una gran consejera y buena compañera catoloca). A *Chelo, Dolores "Pain"* (ise te echa mucho en falta!), *Jessica* (por los buenos momentos que he pasado en Buñol, y que espero repetir) y el resto de compañeros de laboratorio por pasar buenos ratos durante el trabajo.

A mis hermanos *Javi y Nuria*, a mis tías *Chus y Paz*, quienes dan la vida por ayudar a los demás, a la peña de Rocafort: *Andrea* (buena amiga, aunque algunas veces se olvide del movil), *Rubén, Javi 4, Jessi, Manolo*, etc. A *las Alex, Rodríguez y Ribes*, a *Marta y Guio*, por ser muy buenas amigas y estar ahí siempre (y escuchar mis historietas del laboratorio). A *Mati* (grandísima amiga y persona, y futura doctora en ecología) y *Paco* (ila simbiosis!, es broma) cuya tesis espero que sea la siguiente...A *Gemma* (el selectivo une a la gente), a *Victor y David* (no hay mejor amigo en el mundo entero), y a toda la peña del grupo loco de Biológicas que por una u otra razón, sobretodo laboral, es imposible vernos: *Jose* (aunque tu no tienes excusa), *Lucía, Chore, Elia, Iván, Juanma* (aunque Medicina une), *Isa*, etc. A *Laura*, prometo no volver a perder el contacto contigo. A *Marta F.* por ser una gran amiga y ayudarme en los momentos difíciles y a *Reme*, por esos maravillosos regalos que alegran siempre a una.

A tutti i italiani per mostrarme un paese meraviglioso; specialmente a la mia cugina *María* (primuchiii), tornaró...

A *Asunción Molowny y Carlos López*, quienes han sido mis iniciadores en el mundo de la investigación (siempre recordaré los dos años que pasé allí y lo mucho que aprendí), y al resto de personal del

departamento de Biología celular *Xavier Ponsoda, Juan Nacher, Emilio, Quico*, y, en especial, a *Vanessa* (aunque esté en esos mundos nortteños) una buena compañera de trabajo y colega.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. METÁSTASIS.....	1
1.1. CONCEPTOS GENERALES. INEFICIENCIA DEL PROCESO METASTÁTICO.	1
1.2. FASES DEL PROCESO METASTÁTICO.....	7
1.2.1. <i>Pasos previos al proceso metastático: Formación del tumor</i>	
<i>primario y angiogénesis.....</i>	8
1.2.1.1. <i>Formación del tumor primario.</i>	8
1.2.1.2. <i>Angiogénesis.</i>	10
1.2.3. <i>Invasión primaria.....</i>	12
1.2.3.1. <i>Disociación de las células tumorales.</i>	14
1.2.3.1.1. <i>Moléculas de adhesión celular.</i>	14
1.2.3.1.2. <i>Pérdida de la adhesividad intercelular y</i>	
<i>desdiferenciación.</i>	20
1.2.3.2. <i>Proteolisis.</i>	21
1.2.3.3. <i>Locomoción activa.</i>	24
1.2.4. <i>Intravasación, transporte por el torrente circulatorio,</i>	
<i>interacción con el endotelio y extravasación.....</i>	27
1.2.4.1. <i>Interacción entre endotelio y células tumorales: importancia</i>	
<i>en la distribución metastática.</i>	29
1.3. METÁSTASIS Y MELANOMA MALIGNO.	33
1.4. QUIMIO Y RADIORRESISTENCIA.....	35
2. REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN TUMORAL.....	37
2.1. BASES MOLECULARES DEL CICLO CELULAR.	37
2.2. ALTERACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS TUMORALES.	41
2.2.1. <i>Senescencia inducida por oncogenes.....</i>	45
2.3. MUERTE CELULAR.....	49
2.3.1. <i>Conceptos generales y tipología.....</i>	49
2.3.2. <i>Naturaleza molecular del proceso apoptótico.</i>	53
3. RADICALES LIBRES Y CÁNCER.	59
3.1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.	61
3.1.1. <i>Reacciones dañinas de los ROS en las células.</i>	63
3.2. ÓXIDO NÍTRICO Y ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO.	
GENERALIDADES.....	67
3.2.1. <i>Reacciones dañinas de los RNS en las células.</i>	69
3.3. EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES SOBRE LOS TUMORES.....	72
4. SISTEMAS DE DEFENSA CONTRA LOS RADICALES LIBRES.	
.....	76

4.1. DEFENSA ENZIMÁTICA: SOD, CAT Y GPx.....	76
4.2. DEFENSA NO ENZIMÁTICA: PAPEL DE LOS TIOLES NO PROTEICOS.....	79
4.2.1. <i>Conceptos generales.</i>	79
4.2.2. <i>GSH, proliferación tumoral y metástasis.</i>	84
5. REGULACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GSH Y BCL-2 EN CÉLULAS TUMORALES: UNA POSIBLE ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA EFICACIA DE LA TERAPIA ANTITUMORAL.....	89
5.1. DEPLECIÓN SELECTIVA DE GSH EN CÉLULAS METASTÁTICAS.....	92
5.1.1. <i>La síntesis.</i>	92
5.1.2. <i>Transporte extracelular.</i>	94
5.1.3. <i>Depleción de GSH mitocondrial.</i>	97
5.2. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE BCL-2 EN CÉLULAS TUMORALES.	100
OBJETIVOS.....	103
MATERIAL Y MÉTODOS.....	107
1. CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA B16 (B16M).....	109
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	109
3. DIETA ENRIQUECIDA CON GLN (GED).	110
4. SISTEMA DE PERIFUSIÓN DE CÉLULAS B16M-F10.....	110
5. METABOLITOS.....	112
5.1. <i>Determinación del GSH y GSSG.</i>	112
5.2. <i>Consumo de cistina.</i>	113
5.3. <i>Análisis de aminoácidos.</i>	114
5.4. <i>Transporte de L-Gln del músculo esquelético.</i>	114
5.5. <i>Transporte de GSH mitocondrial.</i>	115
5.6. <i>Determinación de ATP.</i>	116
5.7. <i>Generación de H₂O₂.</i>	116
6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.	117
7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	118
7.1. <i>Actividades enzimáticas relacionadas con el GSH.</i>	118
7.2. <i>Otras actividades enzimáticas.</i>	120
7.2.1. <i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).</i>	120
7.2.2. <i>CAT.</i>	121
7.2.3. <i>Superóxido dismutasa (SOD).</i>	121
7.2.4. <i>Glutamina sintetasa.</i>	122
7.2.5. <i>Aspartato aminotransferasa (AST) o glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT).</i>	123

7.2.6. Alanina aminotransferasa (ALT) o glutamato-piruvato transaminasa (GPT).....	123
7.3.7. Glutamato deshidrogenasa (GIDH).....	124
7.3.8. Glutaminasa.....	124
7.3.9. Lactato deshidrogenasa (LDH).	125
8. TRANSFERENCIA DEL GEN <i>bcl-2</i> Y ANÁLISIS DE BCL-2.....	126
9. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS B16M CON OLIGONUCLEÓTIDOS Y TNF- α	129
10. CITOMETRÍA DE FLUJO.	130
11. ELECTROPORACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS CLONES DE B16M KNOCK-OUT PARA LAS PROTEÍNAS DE MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS (MRP).	130
12. WESTERN BLOTS.....	132
13. RT- PCR.....	133
14. NORTHERN BLOT.....	135
15. CRECIMIENTO LOCAL DEL TUMOR.....	136
16. METÁSTASIS EXPERIMENTAL.	137
17. AISLAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE CÉLULAS B16M-F10 PROVENIENTES DE ESTUDIOS.	138
18. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS DEL ENDOTELIO SINUSOIDAL HEPÁTICO.	139
18.1. Preparación de soluciones enzimáticas.....	139
18.2. Digestión enzimática y disgregación del tejido.....	139
18.3. Separación de las células sinusoidales hepáticas mediante un gradiente isopícnico de metrizamida.....	140
19. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN B16M-CÉLULAS ENDOTELIALES.	141
20. MICROSCOPIA <i>IN VIVO</i>	144
21. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA.	144
22. DETERMINACIÓN CASPASA 3.....	145
23. FRACCIONAMIENTO CELULAR DE B16M-F10 E iB16M.....	145
24. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	146
RESULTADOS.....	147
1. MECANISMOS MOLECULARES QUE CANALIZAN LA SALIDA DE GSH EN CÉLULAS B16M-F10: MRP1 Y UN TRANSPORTADOR DEPENDIENTE DE BCL-2.....	149
2. ESTUDIO DEL CANAL DEPENDIENTE DE BCL-2.....	152

3. ACELERACIÓN DE LA SALIDA DE GSH EN CÉLULAS B16M-F10 INDUCIDAS POR EL OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO ANTI- <i>bcl-2</i> Y VERAPAMIL.	156
4. ASOCIACIÓN DE LA ACELERACIÓN DE LA SALIDA DE GSH CON UNA SOBREENPRESIÓN DE LA γ -GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA EN CÉLULAS B16M-F10.....	158
5. LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD γ -GT PREVIENE EL AUMENTO DE GSH EN CÉLULAS TRATADAS CON EL OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO ANTI- <i>bcl-2</i> Y VRP.....	160
6. SENSIBILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS B16M-F10 A LA CITOTOXICIDAD TUMORAL INDUCIDA POR EL ENDOTELIO VASCULAR.	163
7. OBTENCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES ADAPTADAS A LA GLUTAMINA.	170
8. L-GLN INDUCE CAMBIOS EN EL ESTATUS DEL MTGSH DE LAS CÉLULAS B16M-F10.....	174
9. CITOTOXICIDAD GENERADA POR TNF- α Y <i>bcl-2</i> -AS EN CÉLULAS B16M-F10-GLN ⁺	176
10. LAS CÉLULAS B16M-F10-GLN ⁺ TRATADAS CON <i>bcl-2</i> -AS Y RESISTENTES AL ESTRÉS OXIDATIVO, TIENEN MAYOR ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	181
11. ELIMINACIÓN DE CÉLULAS INVASIVAS SUPERVIVIENTES MEDIANTE QUIMIOTERAPIA.	185
DISCUSIÓN.....	189
1. DEPLECIÓN SELECTIVA DE GSH Y REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE BCL-2.	191
2. CITOTOXICIDAD DEL ENDOTELIO VASCULAR SOBRE CÉLULAS B16M-F10 CON NIVELES DISMINUIDOS DE GSH Y BCL-2	193
3. GSH MITOCONDRIAL Y SUPERVIVENCIA TUMORAL.	195
4. POSIBLE APLICACIÓN CLÍNICA DERIVADA DE ESTE ESTUDIO.	201
CONCLUSIONES	207

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN:

Figura 1. Etapas del proceso metastático.....	7
Figura 2. Células de B16M -F10 <i>in vitro</i> y metástasis hepáticas.....	34
Figura 3. Fases del ciclo celular.....	38
Figura 4. Células apoptóticas de melanoma humano A375.....	50
Figura 5. Producción de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 y defensas antioxidantes.....	78
Figura 6. Estructura del glutatión reducido y oxidado.....	79
Figura 7. Ciclo del γ - glutamilo	82
Figura 8. Ciclo rédox del glutatión.....	83
Figura 9. Interacción de las células metastáticas con el endotelio vascular.....	88

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 1. Esquema del sistema de perfusión.....	111
Figura 2. Esquema del sistema Tet-off (Clontech).....	127
Figura 3. Construcción de Knockout para MRP1.....	131
Figura 4. Inoculación de las células B16M-F10 en la pata de ratones C57BL/6J..	136
Figura 5. Separación de las células B16M-Gln+ mediante “cell sorting”.....	138

RESULTADOS

Tabla I. Salida de GSH de las células B16M-F10 dependiente de L-metionina- y MRP	150
Figura 1. Efectos del anticuerpo anti-CFTR sobre la salida de GSH de células B16M - F10.....	153
Figura 2. Inhibición de CFTR por H-89.....	154
Tabla II. Efectos de la inhibición de CFTR por parte de la molécula H-89 sobre la salida de GSH.....	155
Tabla III. Contenido y liberación de GSH en células B16M -F10 tratadas con <i>bcl-2</i> -AS y VRP.....	157
Tabla IV. Síntesis de GSH en células B16M-F10 sometidas a tratamientos de aceleración de salida de GSH celular.....	158
Tabla V. Aceleración de la salida de GSH asociado con una sobreexpresión de γ -GCS en células B16M-F10.....	159
Tabla VI. Efectos de la inhibición de γ -GT inducida por ACV sobre el contenido de GSH en células B16M-F10 tratadas con <i>bcl-2</i> -AS y VRP.....	161
Tabla VII. Efecto de la depleción de GSH inducida por <i>bcl-2</i> -AS, VRP, y ACV en la interacción <i>in vitro</i> entre células de B16M-F10 y el endotelio vascular.....	164
Figura 3. Fotos de las células B16M-F10 en el HSE.....	166
Tabla VIII. Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con <i>bcl-2</i> -AS, VRP, y ACV sobre la retención y viabilidad de las células de B16M-F10 dentro de la microvasculatura hepática.	167
Tabla IX. Crecimiento tumoral, niveles plasmáticos y salida del músculo esquelético de L-glutamina en ratones portadores de células B16M-F10 alimentados con SD o GED..	171
Tabla X. Adaptaciones inducidas por la GED en el metabolismo de L-glutamina en células B16M-F10.....	173
Tabla XI. Contenidos de GSH y GSSG citosólicos y mitocondriales en células B16M-F10 aisladas de ratones alimentados con SD o GED.....	174
Figura 4. Inhibición del transporte de mtGSH por L-Glu.....	175
Figura 5. Citotoxicidad y contenido en mtGSH en células invasivas.....	177
Tabla XII. Activación molecular de la apoptosis y generación de ROS en iB16M-Gln ⁺ e iB16M -Gln ⁺ tratadas con <i>bcl-2</i> -AS.	180

Tabla XIII. Actividades antioxidantes en células iB16M-Gln ⁺ e iB16M-Gln ⁺ tratadas con <i>bcl-2-AS</i> , y células iB16M-Gln ⁺ tratadas con <i>bcl-2-AS</i> y rmTNF- α	182
Tabla XIV. Efectos de <i>SOD2-AS</i> sobre la citotoxicidad generada por rmTNF- α en células tratadas con <i>bcl-2-AS</i>	184
Figura 6. Selección y eliminación de células de melanoma metastático altamente resistentes.....	186

ABREVIATURAS

•OH	Radical hidroxilo
8-OH-Cyt	8-hidroxicitosina
8-OH-Gua	8-hidroxi guanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AIP	Factor inductor de apoptosis
AP-1	proteína activadora -1
AAPF-1	Factor activador de apoptosis
APC	Poliposis colónica adenomatosa
ARF	Factor de ribosilación de ADP
RNA	Ácido ribonucleico
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
B16M-F1	Células de melanoma murino con bajo poder metastático
B16M-F10	Células de melanoma murino con alto poder metastático
B16M-F10-Gln ⁺	Células de B16M-F10 adaptadas a glutamina
BCECF-AM	acetoximetiléster 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5- y – 6-carboxifluoresceína
<i>bcl-2</i> -AS	Oligonucleótido antisentido anti- <i>bcl-2</i>
BCRP	Proteína de resistencia al cáncer de pecho
BSO	L-butionina-(S, R)-sulfoximina
CAM	Moléculas de adhesión celular

CAT	catalasa
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenceno
CdKs	Quinasas dependientes de ciclinas
citGSH	GSH citosólico
DAPK	Proteína asociada a la muerte
DD	Dominio de muerte
DFF45	Factor 45 de fragmentación del DNA
DISC	Complejo de señalización inductor de la muerte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
E2F	Factor de transcripción
ERK	Quinasa de regulación extracelular
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FAS	Ácido graso sintasa
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLIP	Proteína inhibidora de flice(caspasa8)
FMN	Flavín mononucleótido
G3PDH	Glicelardehido-3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GED	Dieta enriquecida con L-Gln
GIDH	Glutamato deshidrogenasa
L-Gln	Glutamina
L-Glu	Glutamato
GOT	Glutamato-oxalacetato transaminasa

GPT	Glutamato-piruvato transaminasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro (glutación oxidado)
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDB16M	Melanoma B16 con alta densidad
HGF/SF	Factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión
HNE	4-hidroxi-3-nonenal
HRP	Peroxidasa de rábano picante
hr-iB16M-Gln ⁺	Células de B16M-F10 invasivas y muy resistentes adaptadas a glutamina
HSE	Endotelio sinusoidal hepático
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IFN- γ	Interferón- γ
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina
IGF-BP3	Proteína de unión a IGF
IGF-II	Factor de crecimiento tipo insulina II
IL	Interleuquina
iB16M-Gln ⁺	Células de B16M-F10 invasivas adaptadas a glutamina
IUDR	Análogo radiactivo de la timidina
JNK	Quinasa n-terminal de c-Jun
JPS	Síndrome de poliposis juvenil

LDH	L-lactato deshidrogenasa
LDB16M	Melanoma B16 con baja densidad
LRP	Proteína de resistencia pulmonar
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MDA	malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
MDR	multirresistencia a drogas
MIC-1	Factor de crecimiento transformante- β similar a citokina
MMP	Metaloproteasas
SOD2-AS	Oligonucleótido antisentido anti-SOD2
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
MRP	Proteína de multirresistencia a drogas
mtGSH	GSH mitocondrial
NADPH	NAD fosfato reducido
NF κ B	Factor nuclear kappa de los linfocitos B
NO	Óxido nítrico
NO $^{\cdot-}$	Nitroxilo
NOS	Óxido nítrico sintasa
O $_2$	Oxígeno molecular
O $_2^{\cdot-}$	Ión superóxido
O $_3$	Ozono
ONOO $^-$	Peroxinitrito
PCA	Ácido perclórico

PD-ECGF	Factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas
PECAM	Moléculas de adhesión endotelial
PGF	Factor de crecimiento placentario
PKC	Proteína Quinasa C
pRB	Gen del retinoblastoma
PTPC	Complejo del poro de permeabilidad transitoria
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SD	Dieta estándar
SOD	Superóxido dismutasa
TetR	Proteína represora de Tet de <i>E.coli</i>
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TIMP	Proteína tisular inhibidora de metaloproteasas
TNFR	Receptor de TNF
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
tPA	Activador del plasminógeno tisular
TPMP	Metiltrifenilfosfato
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNFR
Traf	Factor asociado al TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina
tTA	Transactivador controlado por tetraciclina

UPA	Activador del plasminógeno uroquinasa
VCAM	Moléculas de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VLA-4	Antígeno muy tardío 4
γ -GT	γ -glutamil-transpeptidasa

INTRODUCCIÓN

1. METÁSTASIS.

1.1. Conceptos generales. Ineficiencia del proceso metastático.

Las principales características de las células cancerosas son la pérdida de la capacidad para controlar su ciclo y la inhibición de la diferenciación celular. Ésto es debido a la acumulación de mutaciones en genes relacionados con el control del ciclo celular, oncogenes y genes supresores de tumores, lo cual desemboca en la formación de un tumor primario.

A lo largo de la historia, se han postulado diferentes hipótesis sobre el origen tumoral. Hace dos siglos se propuso que el tumor debía provenir de células normales; Julios Cohnheim en 1867 propuso que los tumores derivaban no de tejidos normales adultos si no de restos celulares embrionarios que describió como “células residuales embrionarias” que se encontraban en los organismos adultos (Rather, 1978).

A lo largo de estos dos siglos se han ido desarrollando las bases genéticas del cáncer y el conocimiento de las mutaciones. Wilhelm Waldeyer desarrolló una teoría con la que predecía que cada célula de un órgano puede desarrollar un tumor. En humanos se generan cerca de 10^{11} células cada día; con un ratio de mutación de 10^6 por gen y generación celular (Cairns, 1975). Se generan diariamente millones de células que portan mutaciones al azar; sin embargo, los tumores son eventos que no se producen con esa frecuencia. Para resolver esta contradicción se postuló la “teoría de tumorigénesis por múltiples pasos”, la cual propone que deben

ocurrir múltiples eventos independientes en una célula con la probabilidad de que se dé cada evento proporcional a la edad del individuo (Fisher y Hollomon, 1951; Nordling, 1953). Sin embargo, el crecimiento exponencial del cáncer con la edad se contradice con datos epidemiológicos, donde muchos cánceres tienen picos de incidencia a ciertas edades y luego declinan (Houghton y cols., 2007). Ello originó que se desarrollara una nueva concepción del origen de la enfermedad: que las mutaciones dieran lugar a un tumor sólo si ocurren en un tipo celular determinado.

Después surgieron otros conceptos como el descrito por Pierce en 1974 que indicó que los tumores podrían contener un pequeño número de “stem cells” (células madre) malignas (Pierce, 1974) ya que cuando se transplantaba en otro huésped (es decir, otro microambiente) células tumorales, individualmente, eran capaces de formar una progenie normal, no maligna. Potter (Potter, 1978) demostró la presencia de marcadores bioquímicos embrionales en hematomas murinos y humanos concluyendo que estas células están paradas en su desarrollo y que el bloqueo de su diferenciación puede contribuir a la formación del tumor. Así pues, tras un siglo, la teoría de Julios Cohnheim resucita y se fortalece.

Las células madre y el origen del cáncer:

Un tumor está compuesto de células heterogéneas con varios grados de diferenciación. Su estructura es muy similar a la de un órgano donde sólo una pequeña fracción de células poseen la propiedad de la autorregeneración, característica de las células madre (Daniel y Brunschwig, 1961; Gou y cols., 2007; Harrington, 2004). Recientemente, se ha desarrollado la hipótesis de la “célula madre cancerosa” (Reya y cols.,

2001). Mediante la aplicación de técnicas usadas en la investigación de las células madre, para identificar poblaciones con la capacidad de autorregeneración, ha sido posible aislar células madre del tumor (Costea y cols., 2006; Ricci-Vitiani y cols., 2007). Su aislamiento y trasplante ha permitido demostrar que sólo unas pocas células dentro del tumor pueden generar tumores heterogéneos, mientras que el trasplante del resto de células no desarrollaba nuevos tumores (Zon y cols., 2004).

Concepto de metástasis:

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, sólo superada por las enfermedades cardiovasculares. La incidencia aumenta progresivamente debido al mayor riesgo en algunos tipos de cáncer y al envejecimiento de la población.

La formación de un tumor primario no es la causa de muerte de la mayoría de los enfermos, si no que fallecen por metástasis.

El término metástasis deriva del griego “methistemi” (Weiss, 2000) y engloba al conjunto de procesos mediante los cuales las células tumorales se diseminan, desde un tumor primario a órganos distantes sin conexión anatómica directa, a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, dando lugar a nuevas colonias o tumores secundarios. Las metástasis son la causa del 90% de las muertes en cánceres humanos (Weigelt y cols., 2005). El desarrollo de la capacidad metastática implica importantes cambios genéticos en el tumor, expresión de genes que codifican proteínas que le permitan disgregarse de la masa tumoral, romper la membrana basal, circular por el torrente sanguíneo, etc.

El principal obstáculo para el tratamiento del cáncer o de las metástasis (tumor secundario) es la heterogeneidad biológica de las células

tumorales debida 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 celular, el microambiente específico de cada órgano puede modificar la respuesta de una célula tumoral metastática a la terapia ; (Fidler y cols., 2006; Tassone y cols., 2007). Las necesidades y funciones que han de satisfacer y adquirir 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 diversificación pone de manifiesto que la regulación del proceso metastático es dependiente del tumor y del órgano donde se produce. Además, existe una interacción necesaria entre las células tumorales y los órganos invadidos; con lo que 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 metástasis, y parece más aconsejable estudiar en cada órgano los elementos microambientales, celulares y moleculares que regulan la metástasis de cada tipo tumoral.

Para que la invasión metastática se produzca, deben superarse todas las fases de la cascada metastática, lo cual hace que el proceso metastático tenga una efectividad muy baja, fenómeno biológico denominado “*ineficiencia metastática*” (Bockhorn y cols., 2007; Liotta y cols., 1974; Weiss, 1990); .

Fidler y Nicolson observaron que tras la inyección de células metastáticas marcadas con un análogo radiactivo de la timidina, $^{125}\text{TUDR}$, algunas eran retenidas en la microvascularización pulmonar y que,

aproximadamente en 24 horas, el 85% de las células retenidas eran destruidas (Fidler y Nicolson, 1977). Posteriores observaciones en diferentes tumores humanos y animales, indicaban que un gran número de las células circulantes eran destruidas en la microcirculación por el ataque del sistema inmunitario, en combinación con un incremento de tensión que sufría la periferia celular tumoral durante la retención en los capilares (Weiss y cols., 1985). La combinación de los datos anatómicos, hemodinámicos e inmunológicos llevó a pensar que estas eran las causas de la ineficiencia metastática (Bockhorn y cols., 2007).

Se ha observado en diferentes experimentos que sólo el 0,01% de las células tumorales metastáticas inyectadas dentro de la circulación, son capaces de generar focos metastáticos (Fidler y Nicolson, 1977; Liotta y cols., 1978; Varani y cols., 1980). Datos de experimentos genéticos clásicos con microarrays y tumores humanos metastáticos, sugieren que la progresión tumoral se correlaciona con la pérdida de función de genes pro-apoptóticos como *BAX*, *p53* y la proteína-quinasa asociada a muerte *DAPK*, o el aumento en la expresión de genes anti-apoptóticos como *bcl-2* o *NFκB* (factor nuclear kappa de los linfocitos B) (Inbal y cols., 1997; Um y cols., 2004).

De hecho se piensa que la resistencia a la apoptosis es una de las ventajas requeridas por la célula tumoral para poder llevar a cabo la formación de un tumor (Hanahan y Weinberg, 2000). La adquisición de la resistencia es importante tanto para el desarrollo del tumor primario como para las etapas posteriores del crecimiento tumoral, es decir, de la metástasis (Mehlen y Puisieux, 2006).

La modulación experimental de factores anti o pro- apoptóticos influye en la eficiencia metastática (Mehlen y Puisieux, 2006). Por ejemplo, células de cáncer de mama que sobreexpresan exógenamente Bcl-2, inducen un aumento significativo del número de metástasis en los pulmones cuando son inyectadas de forma intravenosa o intramuscular en ratones desnudos (Del Bufalo y cols., 1997).

Así pues, la formación de la metástasis es el resultado final de una sucesión de acontecimientos que acaban desencadenando el crecimiento de células malignas en un nuevo órgano, durante el cual, las células tumorales tienen que sobreponerse a diferentes tipos de estrés como el daño mecánico generado por la corriente sanguínea, la pérdida de adhesión, la depleción de nutrientes o la hipoxia, que pueden llevar a la célula tumoral a la muerte por apoptosis (Mehlen y Puisieux, 2006).

El conjunto de estos factores origina una baja eficiencia metastática. Sin embargo esta eficiencia del 0,01%, es suficiente para generar una mortalidad elevada en la población.

1.2. Fases del proceso metastático.

Aunque las bases genéticas de la tumorigénesis pueden variar enormemente, los pasos necesarios para el desarrollo de metástasis son semejantes para todos los tumores. De hecho, para producir lesiones clínicas relevantes, las células metastáticas deben completar todos los pasos del proceso metastático (Fidler, 1990). Las etapas previas a la diseminación metastática (formación del tumor primario y el proceso de angiogénesis) son necesarias para que se inicie la metástasis. Después, la invasión del estroma del órgano ocurre como consecuencia de la expresión de enzimas proteolíticas por parte de las células tumorales. Seguidamente, penetran en los vasos sanguíneos o linfáticos y son transportados hasta los órganos diana donde se extravasarán y proliferarán (figura1). En este punto, el crecimiento de micrometástasis requiere el desarrollo de vasos sanguíneos y la evasión de las defensas del órgano diana (Fidler, 2002).

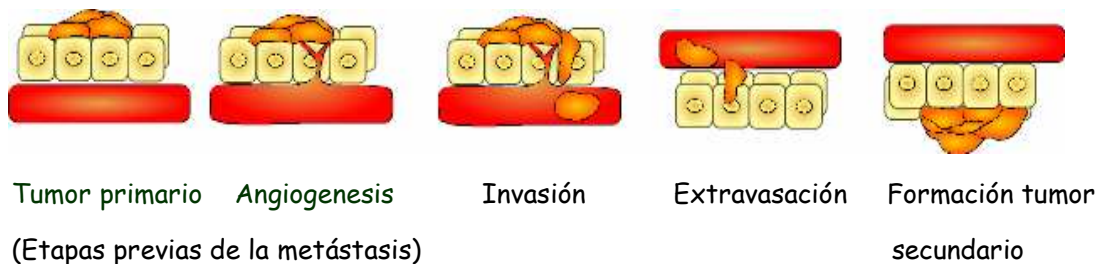


Figura 1. Etapas del proceso metastático.

Llegados a este punto, y antes de explicar las fases de la metástasis, es necesario clarificar porqué existe un patrón de distribución de metástasis, es decir, que un tipo de tumor genere metástasis en un órgano y

no en otro. La mayoría de las metástasis óseas generadas por tumores de mama, próstata y pulmón son un claro ejemplo de la selectividad de las células tumorales por un órgano diana (Woodhouse y cols., 1997).

El patrón de distribución de las metástasis puede venir predeterminado en parte por la red regional de vasos sanguíneos (Red-Horse y cols., 2007). Pero también metastatizan en lugares distantes no predecibles por patrones sanguíneos (Woodhouse y cols., 1997).

Se han propuesto tres posibles mecanismos para esta especificidad:

- a) las células extravasadas crecen selectivamente sólo en los órganos que tienen los factores de crecimiento o el microambiente extracelular idóneos;
- b) por una adhesión selectiva a la membrana luminal del endotelio (únicamente en los órganos diana);
- c) por quimiotaxis de células tumorales circulantes a órganos que producen factores quimiotácticos (Woodhouse y cols., 1997).

1.2.1. Pasos previos al proceso metastático: Formación del tumor primario y angiogénesis.

1.2.1.1. Formación del tumor primario.

El cáncer es una enfermedad genética, independientemente de la causa que lo origine, caracterizada por una “pérdida” del control del ciclo y de la diferenciación celular.

Se han podido identificar muchas de las alteraciones genéticas y epigenéticas, asociadas a la transformación tumoral, con el desarrollo de nuevas técnicas en el campo de la biología molecular, como por ejemplo el estudio del transcriptoma con chips de DNA (ácido desoxirribonucléico)

que permiten la caracterización de grupos de genes cuya expresión varía según el tipo de tumor (de Fraipont, 2007).

Las alteraciones genómicas asociadas con el cáncer pueden implicar cambios a pequeña escala, como la sustitución de un solo nucleótido; o a gran escala, como reordenación cromosómica, ganancia o pérdida de cromosomas, o incluso la integración de genomas virales en el cromosoma. Algunos de estos cambios cromosómicos son tan característicos que pueden utilizarse para el diagnóstico (Klug y Cummings, 1999). Un ejemplo son las aneuploidías relacionadas con la oncogénesis; Mazumbar y cols. han demostrado una relación entre la formación de aneuploidía y la pérdida de función de proteínas motoras implicadas en la mitosis, como es la KIF4 cuya expresión se encuentra disminuida en el 35% de los cánceres humanos (Mazumdar y cols., 2006).

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). Ocasionalmente las mutaciones que se producen en el DNA proporcionan alguna ventaja para la supervivencia celular, ya sea incrementando su capacidad de proliferación o disminuyendo el porcentaje de mortalidad celular. En este aspecto, en las células cancerígenas, se observan mutaciones que afectan a dos tipos de genes: a los protooncogenes, que codifican proteínas que activan la proliferación celular, inhiben la diferenciación celular y bloquean la apoptosis, y a los genes supresores de tumores, que inhiben la proliferación celular. Dichas mutaciones son las responsables de la proliferación celular incontrolada de las células tumorales (Liebermann y cols., 1995).

En la formación del tumor primario se pueden acumular mutaciones que confieren la capacidad de metastatizar. En muchas ocasiones, cuando un tumor primario es detectado, puede contener células con capacidad de invadir otros órganos. Es, por lo tanto, posible que alguna de estas células con capacidad invasiva haya escapado del tumor primario, vía sanguínea o linfática, alcanzado otra localización.

1.2.1.2. Angiogénesis.

La neovascularización o angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos. Este paso es un requisito necesario para la progresión de un tumor (Rak y Yu, 2004). 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).

La proliferación del tumor en ausencia de angiogénesis puede alcanzar volúmenes de 1 mm^3 , que carecen *a priori* de peligro para el hospedador (Folkman, 2006). Además, si se transfecta un oncogén (una construcción con el oncogén *myc*) a una población de células tumorales, aumenta significativamente la actividad angiogénica debido al incremento en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Mareel y Madani, 2006) y a la disminución de la expresión de proteínas antiangiogénicas como la trombosponina-1 (Watnick y cols., 2003).

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).

Existen dos condiciones que guían la neovascularización:

- Por una carga metabólica mayor, como sucede en un ejercicio crónico, la formación de la placenta, el desarrollo fetal o el aumento de la masa tisular.
- Por una insuficiencia del flujo sanguíneo, por ejemplo como resultado de un proceso vaso-oclusivo, como sucede en la retinopatía proliferativa diabética o en la enfermedad isquémica del corazón (D'Amore y Shima, 1996).

La angiogénesis puede ser activada por diferentes procesos como por ejemplo, la respuesta a una situación de hipoxia (Sullivan y Graham, 2007), la estimulación paracrina, o una inflamación (Rak y Yu, 2004).

Aunque los tumores tengan la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, la estructura de estos vasos y la resistencia son diferentes a los del resto del organismo: los vasos tumorales son frecuentemente de **estructura y organización irregulares**; son **porosos, hemorrágicos y tortuosos** (McDonald y Baluk, 2002); debido a ello, el flujo que se genera en dichos vasos es mayoritariamente **caótico** (Cao, 2005) y contienen sangre **poco oxigenada** (Jain, 2003).

La angiogénesis es un proceso estrictamente regulado por el balance entre señales pro- y anti-angiogénicas (Hanahan y Folkman, 1996) producidas tanto por las células tumorales como por el tejido (Hlatky y cols., 1994). Implica varias etapas (Liotta y cols., 1991):

- Degradación de la membrana basal subendotelial y de la matriz extracelular que rodea a los vasos sanguíneos.
- Proliferación de las células endoteliales.

- Migración de las células endoteliales hacia la masa tumoral y formación de nuevos vasos sanguíneos.

Entre los factores pro-angiogénicos actúan factores de crecimiento como el VEGF (Cao, 2005) pero también el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β); el factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF) y el factor de crecimiento placentario (PGF) (Bergers y Benjamin, 2003). También podemos encontrar citocinas como la interleukina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α); metaloproteinasas de la matriz 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). Estos factores angiogénicos pueden también promover el proceso de linfagiogénesis y la metástasis linfática (Cao y Liu, 2007). La expresión de oncogenes y proteínas supresoras de tumores también influye en el balance angiogénico como se ha indicado antes; un ejemplo es el caso del oncogén Ras que se ha correlacionado con un aumento en la expresión del factor pro-angiogénico VEGF (Buchanan y cols., 2004). También se ha observado como células con defectos en la expresión de p53 muestran una disminución en la expresión de TSP1 (es un factor antiangiogénico denominado inhibidor de la angiogénesis trombospondina 1) (Bergers y Benjamin, 2003).

1.2.3. Invasión primaria.

En esta etapa se produce la incursión de las células tumorales pertenecientes al tumor primario dentro del tejido adyacente.

El proceso de invasión está sujeto a una regulación temporal y espacial; la invasión celular ocurre frecuentemente durante el desarrollo animal fisiológico y en el desplazamiento de leucocitos (Duc-Goiran y cols., 1999; Starz-Gaiano y Montell, 2004; Yadav y cols., 2003). La diferencia entre la invasión fisiológica y la maligna es que esta última no cesa (Liotta y cols., 1991). 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. Sólo una pequeña subpoblación de las células tumorales adquiere la capacidad de invadir y sólo un 0.05% de las células serán capaces de metastatizar (Liotta y cols., 1974).

La adquisición del comportamiento invasivo tumoral, que incluye la habilidad de adherirse y migrar por la matriz extracelular, es un paso necesario para la generación de la metástasis. Esta adquisición se debe a la inapropiada regulación de genes cuya función normal es la del control de la invasión celular (Sherwood, 2006).

El proceso invasivo se inicia con la disociación de la masa celular que forma el tumor primario en células simples. La capacidad de las células tumorales para disociarse del tumor primario y migrar activamente está inversamente relacionada con su grado de diferenciación. Un bloqueo de la diferenciación es una característica morfológica constante en muchos tumores malignos; (Gabbert, 1985; Marchal y cols., 2006).

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.

1.2.3.1. Disociación de las células tumorales.

A nivel molecular la disociación de las células tumorales requiere la pérdida de las uniones intercelulares (Engers y Gabbert, 2000). Cambios en la expresión o función de las moléculas de adhesión intercelular contribuyen en la progresión del tumor alterando el estatus de adhesión de la célula y la señalización celular (Cavallaro y Christofori, 2004).

1.2.3.1.1. Moléculas de adhesión celular.

Las moléculas de adhesión celular (CAM) tienen la función de establecer contactos célula-célula y célula-matriz intercelular, así como de informar a la célula sobre lo que está ocurriendo a su alrededor para que ésta pueda responder a los estímulos del microambiente. Todas las CAM muestran 3 características básicas (Freemont, 1998):

1. Son glicoproteínas y actúan como mediadoras moleculares entre el exterior y el interior celular a través de los tres dominios que las constituyen: extracelular, transmembranario e intracelular.

2. Se unen a un ligando específico que actúa como un estímulo externo.

3. 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.

Existen dos tipos distintos de CAM que actúan entre las uniones de adhesión intercelular: una de ellas dependiente de Ca^{2+} y otra

independiente de Ca^{2+} , que parecen ser los principales responsables de la adhesión intercelular específica de tejido observada en estadios embrionarios tempranos. Ambas clases de moléculas de adhesión fueron identificadas inicialmente generando anticuerpos contra moléculas de superficie y luego estudiando la capacidad de estos anticuerpos para inhibir la adhesión celular *in vitro*. Los anticuerpos inhibidores de la adhesión celular fueron utilizados luego para caracterizar y aislar las moléculas de adhesión reconocidas por dichos anticuerpos (Alberts y cols., 2002).

El hecho de que una expresión de marcadores de adhesión anómalos sea común en la mayoría de los tumores, hace de las moléculas de adhesión celular unas candidatas potenciales a dianas terapéuticas antineoplásicas (Syrigos y Karayiannakis, 2006).

Las CAM se pueden agrupar en seis familias:

- Cadherinas:

Las cadherinas son responsables de la adhesión celular dependiente de Ca^{2+} en los tejidos de vertebrados. Fueron denominadas en función de los principales tejidos en los que se encontraron: la cadherina E, que se halla en muchos tipos de células epiteliales; la cadherina N, en células nerviosas, musculares y del cristalino; y la cadherina P, en células placentarias y epidérmicas. En ausencia de Ca^{2+} , las cadherinas sufren un importante cambio conformacional, lo cual origina su reconocimiento y degradación por enzimas proteolíticos (Alberts y cols., 2002).

Son las moléculas más importantes en las interacciones homotípicas célula-célula y están constituidas por un dominio extracelular adherente compuesto de 110 aminoácidos, un segmento transmembrana y un dominio citoplasmático que interactúa con las cateninas que conectan las cadherinas

al citoesqueleto de actina (Behrens, 1999). Se han identificado tres tipos de cateninas: α -, β - y γ -catenina. β - y γ -cateninas forman complejos con la α -catenina y se unen al extremo carboxi-terminal del dominio citoplasmático de las cadherinas (Jou y cols., 1995). Las alteraciones en las moléculas de cateninas pueden llevar a la disminución o incluso anulación de la adhesión célula-célula, aumentando así la capacidad invasiva del tumor (Okegawa y cols., 2004). Un ejemplo es la correlación entre el peor pronóstico en pacientes de cáncer de colon y la pérdida de expresión de E-cadherina y CD44 (Ngan y cols., 2007).

Los complejos cadherina-cateninas se localizan en las uniones *adherens* de muchos tipos celulares, y la conexión con el citoesqueleto es crucial para una adhesión célula-célula eficiente (Ozawa y cols., 1990).

La adhesión celular mediante cadherinas está alterada bajo diversas condiciones fisiológicas como, por ejemplo, la remodelación tisular, la migración celular, o la citoquinesis (Behrens, 1999); pero esta adherencia también se ve alterada en células tumorales. La adhesión es menos eficiente en células malignas que en las normales (Coman, 1944).

La cadherina E es la mejor conocida por su papel como supresor de invasión y metástasis (Engers y Gabbert, 2000; Hayashida y cols., 2005);

- Familia de las inmunoglobulinas:

Son moléculas de adhesión que poseen dominios extracelulares como el de las inmunoglobulinas y median tanto interacciones hemofílicas como heterofílicas. La gran mayoría de estas moléculas median una adhesión independiente de Ca^{2+} , aunque existen algunas adhesiones Ca^{2+} -dependientes (Edelman y Crossin, 1991). Dentro de esta familia se encuentran moléculas que son utilizadas frecuentemente en la

identificación celular por los patólogos como CD3, CD4 y CD8. También pertenecen a esta familia moléculas implicadas en el reconocimiento de antígeno por los linfocitos (Freemont, 1998); así como moléculas que participan en la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular durante los procesos inflamatorios (Mackay y Imhof, 1993). De hecho, las citokinas proinflamatorias TNF- α e interleukina-1 (IL-1) inducen la expresión de la molécula de adhesión celular I (ICAM), la molécula de adhesión vascular (VCAM) y la molécula de adhesión celular plaquetaria-endotelial (PECAM), 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).

- Integrinas:

Están constituidas por dos subunidades glucoproteicas transmembranarias unidas entre sí no covalentemente, denominadas α y β ; ambas contribuyen a la unión de las células a las proteínas de la matriz (Alberts y cols., 2002).

Las integrinas forman una familia que engloba más de 20 miembros y todos son heterodímeros transmembranarios, y la mayoría de ellos poseen la capacidad de interaccionar con varios componentes de la matriz extracelular (Engers y Gabbert, 2000). Muchas proteínas de la matriz en vertebrados son reconocidas por varias integrinas: por ejemplo, por lo menos 8 integrinas se unen a la fibronectina, y un mínimo de 5 a la laminina (Alberts y cols., 2002).

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, y así pueden influir en diferentes funciones

celulares como 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, con quinasas citoplasmáticas y receptores transmembrana de factores de crecimiento (Giancotti y Ruoslahti, 1999). La unión con el citoesqueleto permitirá que se regule la forma, la orientación y el movimiento celulares (Alberts y cols., 2002).

- Selectinas:

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

- 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, habiéndose descrito que las células epiteliales en división activa y las células tumorales invasivas, contienen cantidades significativamente mayores de ácido hialurónico que sus homólogas quiescentes o no tumorales. La causa podría ser la secreción tumoral de ácido hialurónico o de otros factores que inducen su producción en los fibroblastos adyacentes. 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 originan diferentes isoformas del receptor CD44 con diferentes funciones y capacidades de unión al ácido hialurónico (Dougherty y cols., 1994).

- Receptor de proteínas tirosin fosfatasas:

Aunque se sabe que las fosfatasas juegan un papel regulador en ciertas funciones metabólicas celulares, por ejemplo en la activación-inactivación de pasos para la síntesis del glucógeno, se ha demostrado recientemente que juegan un papel en la actividad de varios receptores y en la función de genes que regulan el ciclo celular (Kufe y cols., 2003)

Los receptores 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).

1.2.3.1.2. Pérdida de la adhesividad intercelular y desdiferenciación.

En el proceso de invasión local se hacen necesarios una serie de cambios en la adhesividad 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.

Se ha observado en algunos carcinomas gástricos que, 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 como la invasión *in vitro* en una matriz de colágeno estaba inversamente relacionada con la expresión de cadherina E, y como se podía inhibir la invasión por transfección de dicha cadherina con un vector de expresión (Vleminckx y cols., 1991). También se han encontrado mutaciones en el gen de la cadherina E que dan lugar a proteínas con un dominio extracelular alterado en los carcinomas de mama, así como una disminución en la expresión de cadherina E en otros carcinomas. Otro ejemplo es el expuesto en el apartado anterior donde se indicaba que existe una correlación entre el peor pronóstico en pacientes de cáncer de colon y la pérdida de expresión de cadherina E y CD44 (Ngan y cols., 2007).

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), (Hayashida y cols., 2005). 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); este es el caso del tumor inflamatorio de mama (IBC) donde se ha visto una relación entre niveles elevados de expresión de cadherina E y esta patología (Dong y cols., 2007; Kleer y cols., 2001). 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 delección común en un gen que codifica una proteína homóloga a la superfamilia de las inmunoglobulinas; o bien, cambios en la expresión de integrinas de diferentes tumores (Freemont, 1998).

1.2.3.2. Proteolisis.

En la actualidad se sabe que, para que la célula tumoral inicie la invasión del tejido adyacente y dé lugar a la metástasis, es necesaria toda una cascada de reacciones proteolíticas, en la cual participan serina-, tiol- y metaloproteasas (MMP). Se ha observado que algunas de esas enzimas proteolíticas se encuentran en sangre circulante, mientras que otras son sintetizadas y secretadas por las mismas células tumorales (Rodríguez-Fragoso y cols., 2000).

La degradación de la matriz extracelular y la migración de la célula tumoral son eventos complejos que requieren la producción, liberación y activación de una variedad de enzimas degradantes de la matriz extracelular. Se ha observado una sobreexpresión de esas enzimas en casi

todas las células del microambiente tumoral (Dano y cols., 1985; Plow y Miles, 1990).

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

- MMPs
- Serina proteasas, como el activador del plasminógeno uroquinasa (UPA) o tisular (TPA)
- Cisteína proteasas, como las catepsinas B, C, H y L
- Aspartato proteasas, como la catepsina D

De todos los grupos, los 2 primeros han sido los más intensamente investigados (Sloane y cols., 2006). 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 los componentes de la matriz, proteínas como integrinas o receptores, factores de crecimiento, citokinas 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 indica 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), y se pueden dividir en tres subclases (Mignatti y Rifkin, 1993; Weiss, 2000; Woodhouse y cols., 1997):

1. Colagenasas intersticiales: degradan las regiones triple hélice del colágeno fibrilar tipo I, II, III, VII, VIII y X.
2. Estromelisinias: incluyen a los tipos estromelisina 1, 2 y 3 así como a la matrilisina. Degradan fibronectina, proteoglicanos, laminina y las regiones no helicoidales de colágeno IV.
3. Colagenasas tipo IV (gelatinasas): degradan colágeno triple hélice tipo IV, V, VII, IX y X, así como fibronectina y elastina.

Mientras que durante muchos años las MMPs han sido consideradas como proteínas de degradación de la matriz extracelular, las evidencias han mostrado que esta actividad es sólo una parte de su función biológica en tejidos. De hecho, las MMPs poseen un gran repertorio de sustratos que no están limitados a los componentes de la matriz extracelular. Dentro de las proteínas que pueden ser dianas potenciales de MMPs algunas parecen ser importantes para la actividad anti-tumoral del huésped. Esto explicaría el fallo de un amplio espectro de inhibidores sintéticos de MMPs en la clínica en pacientes con cáncer (Fridman, 2006).

En estudios clínicos se ha determinado, tanto en tumores primarios como metastáticos, una elevada expresión de algunas MMPs, incluyendo las MMP-1,-2,-3,-7,-9,-13,-14; de tal forma que se asocia positivamente

con un pronóstico malo (Deryugina y Quigley, 2006). Pero por el contrario se han visto casos poco frecuentes como por ejemplo: células de cáncer de mama que adquieren la habilidad de metastatizar y tienen reducida la expresión de MMP-8 comparándola con su homólogo no metastático (Agarwal y cols., 2003); o que la deficiencia genética de MMP-8 incrementa la susceptibilidad de ratones *knockout* de MMP-8 para desarrollar tumores de piel (Balbin y cols., 2003); o de forma similar, ratones *knockout* para MMP-3 desarrollan tumores de piel (McCawley y cols., 2004). Todos estos casos raros correlacionan negativamente a la expresión de MMP con la progresión del cáncer.

Las MMPs solubles se encuentran principalmente en su forma proenzimática (Nikkola y cols., 2005) o formando un complejo natural con inhibidores MMP como los TIMPs (inhibidor tisular de metaloproteasas) o α -2-macrotubulina (Baker y cols., 2002). Una sobreexpresión de MMPs está frecuentemente acompañada por un aumento correspondiente en la expresión de TIMPs; como sucede con MMP-9 y TIMP-1 que se han encontrado elevados en suero de pacientes con carcinoma de pulmón (Jumper y cols., 2004).

1.2.3.3. Locomoción activa.

El movimiento celular generalmente es direccional tanto por quimiotaxis (gradientes de moléculas solubles) como por haptotaxis (moléculas insolubles de la matriz extracelular). La capacidad migratoria también se requiere para otras etapas de la metástasis, como es la extravasación desde la circulación hacia los órganos de colonización secundaria.

Existen factores que estimulan la movilidad celular. Estos factores pueden ser divididos en tres grupos. El primero de ellos constituido por factores secretados por las propias células tumorales o factores autocrinos, como el HGF/SF (factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión), el cual actúa normalmente como un factor de crecimiento paracrino, aunque en las células tumorales puede actuar como un factor de movilidad autocrino (Woodhouse y cols., 1997); (Kim y cols., 2006). Actúa a través de un receptor (c-met) de la familia de los receptores transmembrana con actividad tirosin quinasa, expresado en la mayoría de las células epiteliales. Otros factores dentro de este grupo son, por ejemplo, el IGF-II (factor de crecimiento tipo insulina II) (Li y cols., 2007; Sachdev y Yee, 2007) 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 tipos I y IV, y la trombospondina. Varias de estas proteínas de la matriz estimulan la movilidad a través de receptores integrina.

El tercer grupo está constituido por factores de movilidad tumoral secretados por el hospedador como el IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina 1), la IL-8, y la histamina. Son factores de movilidad paracrinos y facilitan un tránsito de las células tumorales hacia el órgano que los genera (Woodhouse y cols., 1997).

Además, la motilidad 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 (receptor de UPA) , que interviene en procesos de migración

celular a través de mecanismos de señalización intracelular (Sidenius y Blasi, 2003). Estudios de los años noventa indican que la actividad migratoria de este sistema podía estar mediada vía activación de algunas integrinas, como la $\alpha\gamma\beta5$ (Yebra y cols., 1996); y también se asoció a este sistema con los componentes de la vía de señalización JAK/STAT1 (Koshelnick y cols., 1997). Estas observaciones, junto al hecho de que algunas integrinas son capaces de actuar como receptores de algunas MMPs, o de estimular su expresión, proporcionan una conexión evidente entre los mecanismos de adhesión, la degradación de la membrana basal y la motilidad 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 un tipo de proteínas de la familia Ras de unión a guanina trifosfato (GTP) 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-miosina (Brzeska y cols., 2004; Kunigal y cols., 2006).

1.2.4. Intravasación, transporte por el torrente circulatorio, interacción con el endotelio y extravasación.

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 células asociadas a los vasos, como los macrófagos. Este hecho, puede aumentar la eficiencia de la intravasación tumoral (Condeelis y Segall, 2003). Tras haber atravesado la matriz extracelular las células tumorales penetran en la circulación, paso que requiere coordinación entre locomoción y proteólisis. En diferentes estudios se ha observado como el pronóstico en pacientes empeora si existe invasión vascular (Gabbert y cols., 1991). Las células tumorales, aisladas o agregadas, pueden quedar retenidas en la vascularización 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. De acuerdo con estas circunstancias, los pulmones e hígado constituyen el destino habitual de las metástasis. 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 organoespecificidad inicial observada en algunos tipos de cánceres (Nicolson, 1988). La primera teoría que contempló esta organoespecificidad 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 ocurría sólo cuando determinadas células tumorales (“seed”, semilla) tenían una especial afinidad por ciertos

órganos (“soil”, suelo). “Soil” también son todas aquellas células del “huésped” que tienen relación con las células tumorales, como por ejemplo las células endoteliales, los fibroblastos convertidos en miofibroblastos por estímulo del TGF- β liberado por células tumorales, células inflamatorias atraídas por quimiokinas liberadas por células cancerosas... (Mareel y Madani, 2006). 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, constituyan parte de un único fenómeno.

Tras la 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 (Glinsky y cols., 2003; Orr y cols., 2000).

Aunque el concepto de diseminación tumoral intravascular clásico está ampliamente extendido, existen otros modelos de invasión. 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, e iniciando la proliferación. 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* cómo células de melanoma son capaces de migrar a lo largo de la superficie endotelial, un modelo identificado como metástasis migratoria extravascular (Lugassy y cols., 2004).

1.2.4.1. Interacción entre endotelio y células tumorales: importancia en la distribución metastática.

Las células endoteliales juegan un papel primordial en el paso de moléculas y células a través de las paredes vasculares. También están implicadas en la síntesis de mediadores de la inflamación y en la regulación del tono vascular mediante la producción de óxido nítrico.

Las funciones de las células endoteliales están moduladas por la exposición a las señales del medio durante el denominado proceso de activación endotelial. Este proceso incluye tanto estimulación de funciones constitutivas como la inducción de actividades y moléculas nuevas (Houle y Huot, 2006). La activación funcional de las células endoteliales está asociada con cambios estructurales profundos, como la reorganización de actina y la modulación de la permeabilidad transendotelial (Wojciak-Stothard y Ridley, 2002).

El proceso celular y molecular que conduce a los leucocitos a incorporarse a los focos de inflamación (Carlos y Harlan, 1994; Mackay y Imhof, 1993; Raud y Lindbom, 1993) sirve para entender la diseminación tumoral. Esta hipótesis ha sido ampliamente demostrada en los últimos años, relacionando procesos normales, como el asentamiento leucocitario, con la adhesión tumoral al endotelio (Honn y cols., 1992).

Estudios *in vitro* en los noventa sugirieron que en la interacción entre la célula tumoral y el endotelio podía estar implicado tanto un “rolling” mediado por selectinas como una adhesión mediada por integrinas a velocidades fisiológicas de flujo sanguíneo (Giavazzi y cols., 1993). La interacción entre el ligando para selectina expresado por las células tumorales y la selectina expresada por las endoteliales es crucial en

la interacción entre las células tumorales y epiteliales (Dimitroff y cols., 2004; Laferriere y cols., 2002; Voura y cols., 1998).

Junto a selectinas e integrinas, las cadherinas, proteínas de la superfamilia inmunoglobulina y moléculas sin clasificar, regulan la unión entre las células tumorales y las endoteliales. Algunas de estas moléculas tienen una expresión constitutiva y parecen tener organoespecificidad en su distribución (Pauli y cols., 1990). Cameron observó, tras la inyección intravenosa de células de melanoma B16-F10, una distribución uniforme inicial de las células metastáticas en el pulmón que, con el paso del tiempo, daban lugar a tumores secundarios de localización selectiva (Cameron y cols., 2000). 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 metastatizaban de manera organoespecífica (Pauli y Lee, 1988); lo cual sugiere que la expresión de moléculas órgano-específicas por parte de las células endoteliales no constituye una característica intrínseca de estas células en cada órgano, sino que puede estar regulada, a su vez, por la composición de la matriz extracelular donde se encuentran.

Otras moléculas son inducibles por señales ambientales como las producidas por citokinas o radicales libres. Dichas señales hacen que se establezcan una serie de contactos iniciales entre las células endoteliales y tumorales, “docking”, por medio de un reconocimiento carbohidrato-carbohidrato. Esto inicia la activación de las células endoteliales y tumorales a través de la liberación de citokinas, 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). Algunas

moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, selectina E) apenas se expresan en condiciones normales. Citokinas como IL-1, TNF- α o IFN- γ (interferón- γ) son los principales estímulos para su expresión (Bevilacqua y cols., 1989; Marlin y Springer, 1987; Osborn y cols., 1989). Son muchas las analogías existentes entre las interacciones de células tumorales y leucocitarias con el endotelio vascular; por ejemplo, la exposición a TNF- α e IL-1 β induce la expresión de VCAM-1 en células endoteliales, lo cual favorece la unión de las células leucocitarias o tumorales a las células endoteliales (Fox-Robichaud y Kubes, 2000; Okahara y cols., 1994; Sturm y cols., 2003).

En 1988, se observó por primera vez, un incremento en la adhesión de células de melanoma humano a células endoteliales activadas por citokinas (Rice y cols., 1988). Trabajos posteriores demostraron que este incremento en la adhesión del melanoma se correlacionaba con una sobreexpresión de moléculas ICAM-1 (Rice y Bevilacqua, 1989). También se demostró cómo células de melanoma, altamente metastáticas, expresan ICAM-1 de forma constitutiva y secretan altas cantidades de IL-1 (Burrows y cols., 1991). A su vez, esta citokina 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.

Se ha demostrado que la integrina VLA-4 (antígeno muy tardío-4), expresada en las células de melanoma, está involucrada en la interacción *in vivo* con la VCAM-1 expresada por las células endoteliales activadas por TNF- α (Okahara y cols., 1994) y por IL-1 (Garofalo y cols., 1995; Martin-Padura y cols., 1991). Concretamente, Orosz y colaboradores demostraron en los noventa 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 células tumorales y endoteliales debía seguir el modelo *rolling along* establecido en la unión con leucocitos.

1.3. Metástasis y melanoma maligno.

El melanoma maligno es uno de los tumores humanos más agresivo y presenta una incidencia creciente, en particular, en países con exposiciones a la luz UV crecientes. La mayoría de las muertes por melanoma son debidas a las metástasis resistentes a terapias convencionales (Fidler y cols., 1990). El melanoma contiene poblaciones celulares heterogéneas caracterizadas por una velocidad de crecimiento diversa, cariotipos distintos, distintas antigenicidad y metástasis, y sensibilidad a la quimioterapia y bioterapia (Fidler y Hart, 1982; Fidler y Poste, 1985).

Uno de los modelos de crecimiento tumoral metastático más utilizado es el melanoma B16. Este modelo fue desarrollado por Isaías Fidler, que aisló un melanoma primario de ratón, lo cultivó *in vitro* y lo inoculó intravenosamente, induciendo con ello la aparición de metástasis pulmonares. Fidler obtuvo variantes celulares con diferente potencial metastático mediante implantes reiterados por vía intravenosa de las células tumorales obtenidas de los focos metastáticos a los que denominó sucesivamente de B16M-F1 a F10. De este modo, se seleccionó una línea celular con un potencial metastático máximo conocida como B16M-F10 obtenida tras 10 inoculaciones reiteradas (Fidler 1973).

Se trata de un modelo muy atractivo desde un punto de vista experimental ya que permite la experimentación *in vitro* e *in vivo* y tiene un comportamiento biológico muy agresivo (figura 2).

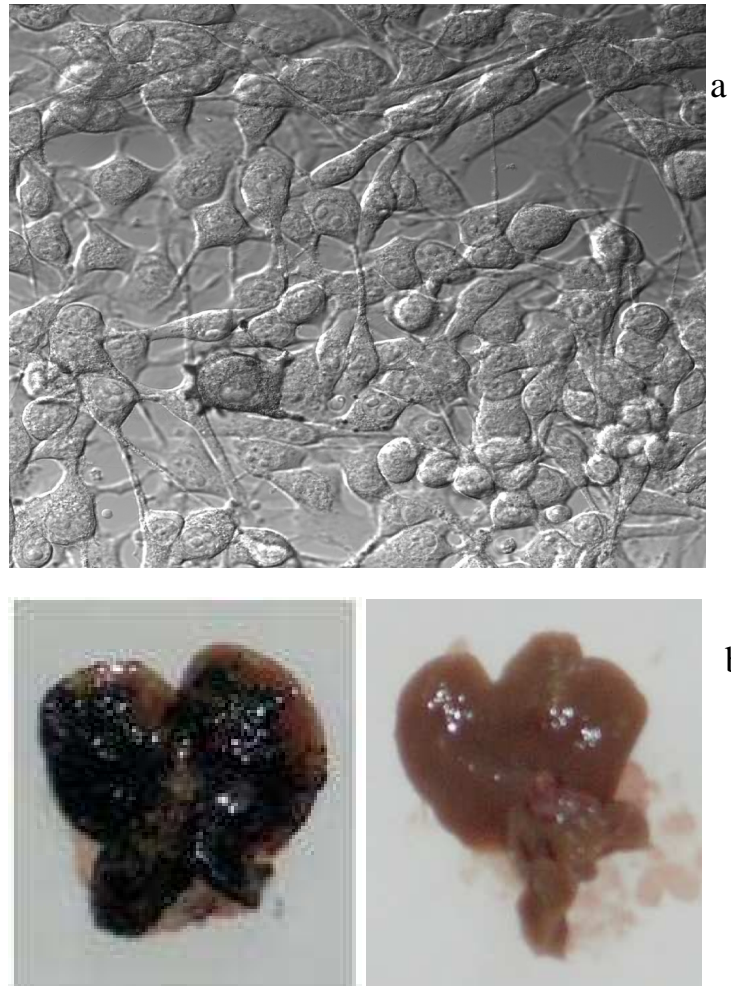


Figura 2. a) Células de B16M -F10 *in vitro*; b) metástasis hepáticas con B16M -F10 (10 días post-inoculación intraesplénica) (izquierda); y un hígado control (derecha).

1.4. Quimio y Radiorresistencia.

Una de las características de mayor importancia del fenotipo maligno es que puede implicar resistencia a diversos fármacos antitumorales y a la radioterapia.

Mecanismos de resistencia a fármacos:

- Disminución de la acumulación de fármacos:

Disminuir los niveles intracelulares de los agentes citotóxicos es uno de los mecanismos de resistencia más común (Kufe y cols., 2003). Los fármacos polares, solubles en agua, no pueden atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular y requieren de mecanismos específicos para poder entrar. La resistencia a estos fármacos puede ser mediada por una disminución en la regulación de los mecanismos de entrada, o también deberse a un aumento de la salida del fármaco de la célula a través de canales denominados MDR (multirresistencia a drogas). Entre las MDR se encuentran la p-glicoproteína (o MDR1), las MRPs (proteínas de multirresistencia), el transportador recientemente aislado BCRP (“proteína de resistencia al cáncer de mama”) (Doyle y cols., 1998; Ross y cols., 1999) y la LRP (“proteína de resistencia pulmonar”).

- Alteración del metabolismo de los fármacos:

La modificación de la activación o inactivación del fármaco o sobre cofactores, pueden conferir resistencia a los agentes antineoplásicos selectivos (Kufe y cols., 2003).

- Aumento en los mecanismos de reparación:

Como consecuencia de la acción del fármaco, tanto directamente como de forma secundaria, se pueden producir daños en las células tumorales; pero éstas utilizan sistemas complejos de reparación de los daños en la membrana y el DNA. Los mecanismos intrínsecos de reparación celular pueden ser alterados y con ello influir sobre la sensibilidad a un fármaco. Por ejemplo, la resistencia a cisplatina, un fármaco cuya acción citotóxica es debida a la unión covalente al DNA con preferencia en la posición N-7 de la guanina y la adenina [es capaz de unirse a dos sitios diferentes en el DNA produciendo uniones cruzadas, ya sea dentro de la misma molécula de DNA (>90%) o entre dos moléculas distintas de DNA (<5%)]. La modificación del DNA (formación de aductos) causa la inhibición de su síntesis y su transcripción. En el caso de la cisplatina, la resistencia puede surgir por una reducción de la acumulación en las células, o por una inactivación aumentada debido a la mayor actividad de las enzimas detoxificantes, o por una mayor actividad de las enzimas de reparación del DNA (Perez y cols., 1998).

- Alteración de las dianas:

Los mecanismos de muerte celular de muchos fármacos envuelven interacciones entre éste y una enzima esencial intracelular. Estas interacciones pueden alterar o inhibir las funciones normales de la enzima. Cambios en estas enzimas comprometer la eficacia del fármaco. Estos cambios se han demostrado en muchas enzimas asociadas con células resistentes a fármacos, incluyendo la dihidrofolato reductasa (Haber y cols., 1981; Haber y cols., 1981), la timidilato sintasa (Armstrong y cols., 1989) y las topoisomerasas I y II (Vassetzky y cols., 1995; Rubin y cols., 1996; Pommier y cols., 1986; Mirski y cols., 1993; Kubota y cols., 1992; Hind y cols., 1991).

2. Regulación de la proliferación tumoral.

2.1. Bases moleculares del ciclo celular.

El ciclo celular es un mecanismo complejo y muy organizado; su función primordial es la de duplicar el DNA y segregar las copias de forma precisa a dos células hijas genéticamente idénticas. Estos procesos definen las dos grandes fases del ciclo: la fase S, durante la cual se produce la duplicación del DNA y que requiere de 10 a 12 horas en las células de mamífero y la fase M (de mitosis) donde se produce la división celular en un tiempo menor (aproximadamente una hora).

Existen dos fases más durante el ciclo. Estas son las fases G_1 y G_2 (Figura 3). En el periodo de tiempo G_1 (Gap1), entre la M y la fase S, la célula es sensible a los estímulos de crecimiento positivo y negativo. En G_2 (Gap2), tras la fase S, la célula se prepara para entrar en mitosis, para lo cual deberá duplicar su masa proteica y sus orgánulos. Existe una quinta fase conocida como fase de quiescencia o G_0 . Las células pueden salir del ciclo activo y entrar en G_0 en determinadas condiciones permaneciendo en dicha fase horas, días, semanas... hasta que las condiciones externas favorezcan su entrada en el ciclo.

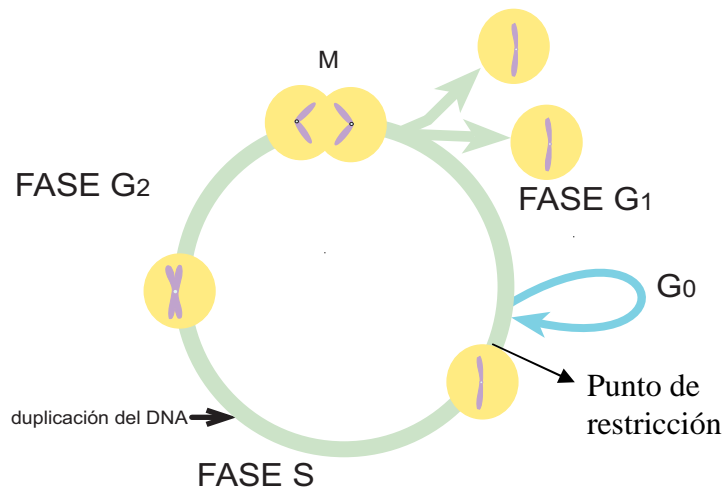


Figura 3. Fases del ciclo celular.

El ciclo celular está controlado por quinasas dependientes de ciclinas, ciclinas e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.

El sistema de control del ciclo es esencialmente el mismo en todas las células eucariotas. Las proteínas del sistema aparecieron por primera vez hace billones de años. Se han conservado durante el curso de la evolución de tal manera que muchas de ellas funcionan perfectamente cuando se las transfieren de una célula humana a una de levadura (Alberts y cols., 2002).

El ciclo celular está controlado por la fosforilación de diferentes proteínas, llevada a cabo por una familia de serina/treonina quinasas llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las CDKs son activadas por ciclinas, llamadas así por la variación cíclica de su concentración a lo largo del ciclo. Algunas CDKs son activadas por una o más ciclinas, por lo que pueden mantenerse activas durante largos periodos.

Una célula sometida a un estímulo de división celular como, por ejemplo, por factores de crecimiento, puede abandonar su estado de quiescencia (G_0) y entrar en G_1 . En este momento existe un sistema de control denominado punto de restricción, donde se decide si continúa con el ciclo o no. Como resultado de la estimulación se produce un aumento en la expresión de ciclinas D y E, las cuales activarán diferentes quinasas (Gillett y Barnes, 1998): la ciclina D1 forma complejos con CDK4 y CDK6 y las ciclinas D2 y D3 con CDK4, CDK6 y CDK2. Todo ello contribuye a la fosforilación del producto del gen del retinoblastoma (pRB). pRB posee 16 sitios potenciales de fosforilación por CDK. Al principio de la fase G_1 la pRB se encuentra hipofosforilada, en este estado se encuentra unida y reprime la actividad de la familia de factores de transcripción E2F, los regulan la expresión de genes necesarios en la fase S (Harbour y Dean, 2000). La activación de CDK2, CDK4 y CDK6 inicia la fosforilación de pRB. Las ciclinas D incrementan su concentración hasta alcanzar un pico justo antes de la fase S, posteriormente su concentración comienza a descender con lo que CDK4 y CDK6 dejarán su estado activo. Aproximadamente en la mitad de la fase G_1 comienzan a aumentar los niveles de ciclina E; ésta activa a CDK2 la cual completará el proceso de fosforilación de pRB. Esto permite que se rompa la interacción pRB-E2F, de forma que E2F pasará a ser transcripcionalmente activo y el ciclo celular continuará en la fase S (Harbour y cols., 1999). Una vez la célula entra en fase S, la ciclina E es degradada. La ciclina A es expresada y se une a CDK2, el complejo resultante es muy importante en la iniciación y mantenimiento de la síntesis de DNA (Gillett y Barnes, 1998). Hacia el final de la fase S la ciclina A comienza a activar a la CDK1. Esta señal indica que la fase S se ha completado y comienza la fase G_2 . En este punto

existe otro punto de control (*checkpoint*) para asegurar que la fase S se ha completado. Posteriormente en G₂ existe otro punto de control que, como en G₁, es un sensor de daño en el DNA, de forma que se asegura la fidelidad de la replicación. Para la progresión de G₂ hacia mitosis se requiere que CDK1 forme complejo con la ciclina B, la cual ha ido acumulándose a lo largo de G₂ (Gillett y Barnes, 1998).

2.2. Alteración del ciclo celular en células tumorales.

El ciclo vital de una célula está controlado por dos clases de genes que, en su conjunto, constituyen una pequeña proporción de toda su dotación genética. Estas dos clases son los protooncogenes y los genes supresores de tumores, los principales responsables de la proliferación celular incontrolada que se observa en los tumores (Liebermann y cols., 1995). Cuando mutan los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes carcinogénicos capaces de dirigir una proliferación descontrolada, debido al exceso de transcripción de proteína estimuladora del crecimiento o bien una forma hiperactiva de la misma, por lo cual se describieron como dominantes o positivos (Polsky y Cordon-Cardo, 2003). Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando se producen en ellos mutaciones que los silencian, por lo que se han denominado negativas o recesivas (Polsky y Cordon-Cardo, 2003).

Diferentes cambios genómicos pueden inducir activación oncogénica. Se han observado oncogenes con una mutación puntual, la cual tiene la capacidad de alterar la función de la proteína mutada, como por ejemplo ocurre con la proteína Ras (Polsky y Cordon-Cardo, 2003); este tipo de cambios génicos son investigados ampliamente hoy en día. Recientemente, se han descubierto diferentes mutaciones somáticas (como el gen de la tirosín quinasa *EPHA3* o el gen *OBSCN*) implicadas en distintos cánceres como glioblastoma, melanoma y cáncer de páncreas (Balakrishnan y cols., 2007). En otros casos, se ha observado una translocación genética, de forma que el protooncogén queda bajo el control de un promotor activo. Así que la proliferación celular no cesa porque el

oncogén es continuamente expresado, como por ejemplo ocurre en el linfoma de Burkitt donde *myc* está bajo el control del promotor para la cadena pesada de inmunoglobulina, el cual es muy activo (Polsky y Cordon-Cardo, 2003). También puede ocurrir que exista una sobreproducción de proteína oncogénica debido a una amplificación del DNA por replicación repetitiva de una región cromosómica específica.

Cuando un factor estimulador del crecimiento se une a un receptor, éste transmite una señal de proliferación a otras proteínas citoplasmáticas; a su vez, estas proteínas desencadenan una cascada de señales estimuladoras que terminan en el núcleo de la célula, donde son activados los factores de transcripción. Éstos responden activando la transcripción de un conjunto de genes cuya expresión determina el inicio del ciclo celular (Pardee, 1989).

Existen oncogenes que obligan a la célula a producir en exceso factores de crecimiento. Los sarcomas y gliomas, por ejemplo, liberan cantidades excesivas de PDGF. Otros tipos de cánceres, secretan excesivas cantidades de TGF- α [estos factores actúan sobre las células vecinas, pero también sobre la propia célula que los fabrica (De Boer y cols., 1997)] o cánceres de páncreas que sobreexpresan la serín proteasa tPA que induce la proliferación celular mediante la activación de una cascada de señalización que conduce a la activación de los genes que codifican a EGF y MMP-9 (Hurtado y cols., 2007). En melanoma se han observado mutaciones puntuales que producen alteraciones sobre receptores de factores de crecimiento, como el receptor tirosina quinasa MET, lo cual produce una actividad anormal (Polsky y Cordon-Cardo, 2003).

En cuanto a la modificación de la transducción de la señal se han observado oncogenes que perturban la cascada de señales en algún punto del citoplasma. El ejemplo mejor conocido es la familia de oncogenes *ras*. Las proteínas que codifican los oncogenes normales *ras* transmiten señales estimuladoras, procedentes de los receptores de factores de crecimiento, a otras proteínas que continúan las cascadas de señales. Las proteínas que codifican los oncogenes mutantes *ras* están siempre activas, aunque los receptores de los factores de crecimiento no les estén enviando señales. En casi una cuarta parte de los tumores humanos se encuentran proteínas Ras hiperactivas (Pardee, 1989; Polsky y Cordon-Cardo, 2003).

Otros oncogenes, como los de la familia *myc*, alteran la actividad de los factores de transcripción nucleares (Cole y Nikiforov, 2006; Cowling y Cole, 2006). En condiciones normales, las células producen factores de transcripción Myc sólo cuando son estimuladas por factores de crecimiento que afectan a la superficie celular. Una vez sintetizadas, las proteínas Myc activan genes que inducen el crecimiento celular. En muchos tipos de cánceres, sobre todo los sanguíneos, los niveles de Myc se mantienen siempre altos, aunque falten los factores de crecimiento (Liebermann y cols., 1995; Pardee, 1989; Polsky y Cordon-Cardo, 2003).

La hipótesis postulada por Knudson para explicar la predisposición genética al cáncer se mantiene para la mayoría de las proteínas supresoras de tumores: “una mutación en un alelo de un gen supresor de tumores en una línea germinal predispone a la formación de un tumor, ya que, la mutación somática en el segundo alelo puede desencadenar la iniciación y progresión tumoral” (Knudson, 1971). Algunos ejemplos de proteínas supresoras de tumores son p53 o E2f-1. La expresión del primero se encuentra alterada en la mayoría de los tumores humanos (Zornig y cols.,

2001). La falta de expresión de E2f-1, en ratones, aumenta la susceptibilidad a padecer tumores (Yamasaki y cols., 1996). Pero no sólo la deficiencia en la expresión es causa de la aparición de tumores, sino que un fenotipo normal con baja velocidad de expresión combinada con una vida media corta, también puede dar lugar a la aparición de un fenotipo maligno. (Macleod, 2000). El fenómeno por el cual la proteína producida por una sola copia de un gen no es suficiente para garantizar una función normal, es conocido como haploinsuficiencia; ejemplos de haploinsuficiencia son la del gen que codifica a MAD-1 (proteína deficiente de parada mitótica-1) que provoca un aumento en la incidencia de neoplasias en ratones (Iwanaga y cols., 2007), o la que encontramos en el gen supresor de tumor de PTEN donde, tanto en humanos como en ratones, la expresión de un sola copia del gen no es suficiente para prevenir la tumorigénesis (Macleod, 2000).

Los genes supresores de tumores pueden clasificarse como: *gatekeeper*, *caretaker* y *landscaper*.

El concepto de *gatekeeper* surgió para explicar el papel del gen supresor de tumor *APC* (poliposis colónica adenomatosa) que se encuentra mutado en las fases tempranas de la tumorigénesis colorrectal (Kinzler y Vogelstein, 1996). Se considera el gen mutado *APC* como fase limitante de la velocidad de formación del tumor y de formación de mutaciones en otros *loci* como p53.

Los genes *gatekeeper* se diferencian de los *caretaker* y de los *landscapers* por el hecho de que, primero, su pérdida funcional conlleva una limitación en el proceso de tumorigénesis, y segundo actúan directamente en la prevención del crecimiento tumoral.

Los genes supresores de tumores clasificados como *caretaker*, actúan indirectamente en la supresión del crecimiento asegurando la fidelidad de la codificación del DNA, mediante la reparación de los daños del DNA o la prevención de la inestabilidad genómica (como por ejemplo la inestabilidad de microsatélites o cromosómica) ; (Kinzler y Vogelstein, 1996; Lengauer y cols., 1998; van Puijbroek y cols., 2006).

En el caso del gen p53, se podría clasificar tanto como *gatekeeper* como *caretaker* ya que induce la apoptosis (actuaría como *gatekeeper*) pero también tiene un papel como “guardián del genoma” donde su mayor función es prevenir la inestabilidad genómica (en este caso actuaría como *caretaker*) (Lane, 1992).

En el caso del concepto de *landscaper*, se describió por primera vez al analizar histológicamente las mutaciones ocurridas en el síndrome de poliposis juvenil (JPS) donde las lesiones iniciales parecían ocurrir en las células del estroma que envuelven al tumor y no en las propias células tumorales (Kinzler y Vogelstein, 1998). Los genes supresores *landscaper* actúan modulando el microambiente donde crecen las células tumorales, quizás mediante una regulación directa/indirecta de las proteínas de la matriz extracelular, de marcadores de superficie celular, proteínas de adhesión o factores de supervivencia/crecimiento secretados. La pérdida de su función podría promover la transformación neoplásica del epitelio adyacente (Macleod, 2000).

2.2.1. Senescencia inducida por oncogenes

En la célula se puede activar un proceso denominado senescencia; en ella se produce un estado caracterizado por la parada permanente del ciclo celular y por cambios específicos en la morfología y expresión génica

que distinguen a la senescencia del proceso de quiescencia (parada reversible del ciclo celular) (Campisi, 2001; Shay y Roninson, 2004).

Hace décadas Hayflick y Moorhead (Hayflick y Moorhead, 1961) describieron por primera vez el fenómeno de senescencia “replicativa” como el proceso que se daba en células estables con ciclo celular parado, al que han llegado tras un número finito de divisiones celulares. Las células que sufren este fenómeno las describen Hayflick y Moorhead como células alargadas, con grandes vacuolas y asociadas a la actividad de la β -galactosidasa ácida, la cual parece corresponderse con la enzima β -galactosidasa liposomal (Dimri y cols., 1995; Lee y cols., 2006). Dicha actividad de la β -galactosidasa se visualiza mediante una reacción citoquímica (Gary y Kindell, 2005), por esta razón, es un marcador de senescencia muy utilizado. La senescencia de Hayflick es resultado de lo que sucede durante la replicación del DNA, por ello se denominó senescencia “replicativa”.

En la mayoría de las células humanas, los **telómeros** se van acortando de 25 a 200 pares de bases cada vez que el cromosoma se replica durante la fase S del ciclo celular, puesto que las DNA polimerasas sintetizan las nuevas hebras de DNA en el sentido 5'-3' y necesitan un *primer* de RNA para empezar, y, por lo tanto, no pueden copiar los extremos de los cromosomas. Cuando la disminución de los telómeros sobrepasa cierta longitud crítica, las células inician la fase de senescencia y dejan de dividirse. Si las células hacen caso omiso de esta señal, la progresión en el acortamiento de los telómeros dispara la crisis, ya que el excesivo acortamiento de los telómeros provoca que los cromosomas se fusionen unos con otros o se rompan, generando un caos genético fatal para la célula (Harley, 1994). Sin embargo, estas defensas genéticas se pierden

en la mayoría de las células cancerosas debido a la activación de un gen que codifica una telomerasa (Lundblad y Szostak, 1989). Esta enzima de naturaleza ribonucleoproteica, virtualmente ausente en la mayoría de células sanas, pero presente en casi todas las células cancerosas, reemplaza sistemáticamente los segmentos teloméricos que se pierden en cada ciclo celular. La telomerasa mantiene así la integridad de los telómeros y permite que las células se repliquen sin fin (Feldser y Greider, 2007; Kim y cols., 1994).

Mientras que la senescencia “replicativa” se dispara por la erosión de telómeros durante las divisiones celulares, un fenotipo similar puede ocurrir en células jóvenes como respuesta a oncogenes, daño en el DNA o estrés oxidativo (Campisi, 2001; Shay y Roninson, 2004).

La senescencia no replicativa se inicia mediante señales producidas por productos proteicos de oncogenes, acompañadas de la activación de una red de supresión tumoral (Mooi y Peeper, 2006). Un ejemplo de ello lo podemos ver con el oncogén de la proteína Ras que promueve la senescencia en células murinas y humanas dependiendo de los productos de los genes *INK4a/ARF* que codifican las proteínas p16 y ARF [factor de ribosilación de ADP (adenina difosfato)] (Lowe y Sherr, 2003; Sherr, 2001). La cascada de señalización de la proteína MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) es la principal responsable en la ruta de Ras de la senescencia celular ya que induce p16 y ARF y finalmente activa Rb y p53 respectivamente (Lowe y Sherr, 2003; Shay y Roninson, 2004).

Es difícil obtener evidencias directas de éste fenómeno *in vivo*, sin embargo, estudios recientes aportan nociones de que este tipo de

senescencia es un mecanismo que *in vivo* contribuye a la protección contra el cáncer (Braig y cols., 2005; Michaloglou y cols., 2005)

En términos generales, tanto la senescencia como la apoptosis (muerte celular programada, ver apartado 2.3) parecen perseguir los mismos fines en la supresión tumoral. Ambas representan una respuesta irreversible de inhibición del crecimiento celular que actúa como una barrera potente para la evolución a una célula neoplásica. De hecho, muchas de las señales que promueven la apoptosis en un tipo celular, inducen senescencia en otros. Por ejemplo, tanto E2F como Myc pueden ser o pro-apoptóticos o pro-senescentes dependiendo del tipo celular, los niveles a los cuales son expresados y la ausencia de otras señales pro-apoptóticas o señales que promueven la proliferación (Dimri y cols., 2000).

2.3. Muerte celular.

2.3.1. Conceptos generales y tipología.

Existe un tipo de muerte celular denominada **programada** que es un proceso fisiológico, conservado durante la evolución, con una gran importancia en el desarrollo y homeostasis tisular tanto en especies de vertebrados como de invertebrados. Por esta razón, tanto su defecto como su exceso desencadenan procesos patológicos (Meier y cols., 2000; Yuan y Yankner, 2000). Tradicionalmente la muerte celular programada se ha clasificado en función de observaciones morfológicas. John Kerr, patólogo australiano, observó en 1972 una serie de características morfológicas comunes en células que estaban muriendo, las cuales denominó con el término apoptosis (del griego “apo”, aparte, y “ptosis”, caída). Estas células presentaban condensación cromatínica, retracción celular, incremento en la densidad, aparición de vesículas en la membrana plasmática, escisión del DNA en fragmentos internucleosomales y, finalmente, la formación de unas pequeñas vesículas rodeadas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos (Kerr y cols., 1972); los cuales, una vez se disgreguen, serán fagocitados por células vecinas (macrófagos, células epiteliales normales, células endoteliales o las propias células tumorales) (Wyllie y cols., 1981).

La muerte celular programada ha sido clasificada por diferentes autores en subclases, aunque con diferentes criterios. Todas las clasificaciones propuestas convergen en dos aspectos: a) la apoptosis está estrictamente regulada *in vivo* y b) una célula puede mostrar características de varias subclases de muerte simultáneamente (Bursch y cols., 1996; Leist

y Jaattela, 2001). Por esta razón, las clasificaciones realizadas no deben considerarse como estáticas ni cerradas. Históricamente se han caracterizado en tres tipos, basándose en las características morfológicas: la muerte tipo I, que es la apoptosis clásica, la muerte tipo II y la muerte tipo III o muerte no lisosomal (Debnath y cols., 2005).

Una posible unificación de las clasificaciones propuestas para las subclases de muerte celular programada puede ser la siguiente:

- **Apoptosis** clásica, proceso dependiente de caspasas (cisteín aspartatil proteasas, ver apartado 2.3.2 de introducción) y caracterizado por la condensación cromatínica. Las caspasas juegan un papel en la activación del factor 45 de fragmentación de DNA (DFF45) que es responsable de la compactación cromatínica (Sakahira y cols., 1998)(figura 4).

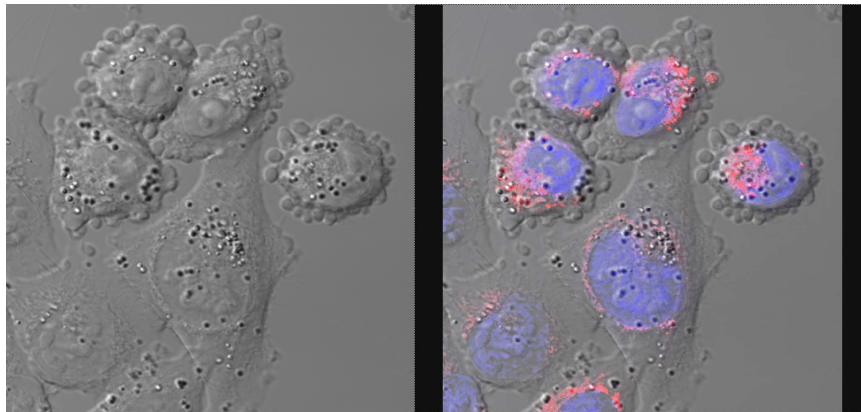


Figura 4. Células apoptóticas de melanoma humano A375. Foto realizada mediante microscopía confocal. Marcaje realizado con Hoescht 33342 (marcaje de ácidos nucleicos) en azul y Mito Tracker Red (marcaje de mitocondrias) en rojo.

- **Muerte celular programada similar a la apoptosis**, la cual presenta una menor compactación cromatínica. La muerte celular

similar a apoptosis es independiente de caspasas y tiene lugar por la acción de la endonucleasa G, una DNasa mitocondrial que es liberada en respuesta a diferentes estímulos apoptóticos (Bahi y cols., 2006; Li y cols., 2001). En una clasificación estrictamente morfológica, dentro de este grupo también se engloban parte de modelos caspasa dependiente. Por ejemplo, ante una carencia de DFF45, a pesar de actuar las caspasas, no se producirá la condensación cromatínica (Zhang y cols., 1999) característica del primer modelo; por lo que morfológicamente estaría incluida en la muerte celular similar a apoptosis.

– **Muerte celular programada similar a la necrosis**, con ausencia de compactación cromatínica, englobaría:

a) la muerte celular autofágica (corresponde con la muerte tipo II), caracterizada por la aparición de vacuolas autofágicas en el citoplasma, seguido de una dilatación mitocondrial y un alargamiento del retículo endoplasmático y del aparato de golgi (Schweichel y Merker, 1973); se ha podido observar tanto *in Vitro* como *in vivo* (Aoki y cols., 2007). Por ello se la ha propuesto como el mecanismo “alternativo” de muerte celular. En mamíferos este tipo de muerte se observa durante el desarrollo, incluyendo la regresión del corpus luteum, la involución de las glándulas mamarias y la próstata entre otros eventos (Debnath y cols., 2005).

b) la muerte celular inducida por receptor de muerte (Vercammen y cols., 1998);

c) la muerte descrita por Bowen durante el desarrollo de embriones en 1982 (Bowen y cols., 1982) (es la tipo III), y más tarde Clarke quien observó una degeneración vacuolar, hinchamiento de los orgánulos sin activación lisosomal (Clarke, 1990) con ausencia de compactación cromatínica. Posteriormente se describió un posible paso clave para el desarrollo de este tipo de muerte celular: una disfunción del aparato de Golgi (Szende y cols., 1995).

Por último, existe otro tipo de muerte celular “accidental” denominada **necrosis** (no entraría en el grupo de muerte celular programada); un proceso patológico que tiene lugar cuando las células son sometidas a agresiones severas (Walker y cols., 1988), como por ejemplo la hipertermia (Buckley, 1972), la isquemia (Borgers y cols., 1987), la acción de venenos metabólicos (Trump y cols., 1984) o la lesión celular directa (Trump y Bulger, 1967). Una célula que muere por necrosis manifiesta características bien diferenciadas del resto de tipos de muerte celular. Los primeros cambios incluyen hinchazón de citoplasma y orgánulos (especialmente de las mitocondrias) por la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Trump y cols., 1984), consecuencia de la alteración de las bombas iónicas por daño directo en la propia membrana (Schanne y cols., 1979) o por depleción de ATP (Jennings y Reimer, 1981). Estas alteraciones acaban por desestructurar a orgánulos y membrana plasmática, provocando la salida del contenido celular al espacio extracelular, y desencadenando una respuesta inflamatoria asociada.

2.3.2. Naturaleza molecular del proceso apoptótico.

Durante la fase de inducción de la apoptosis, las células reciben una serie de estímulos que son integrados en el conjunto celular. En función de diferentes factores, como el estatus metabólico, la fase del ciclo celular, etc. se activará o no la cascada apoptótica. Independientemente del estímulo inicial (por ejemplo, xenobióticos, retirada de factores de crecimiento, radiaciones- γ , acción de virus...), todas las señales apoptóticas parecen converger en un punto común que provoca la muerte celular.

Se han descrito dos formas de desarrollarse el proceso apoptótico en células mamíferas. Una requiere la participación de la mitocondria y se denomina forma intrínseca; y la forma donde no se da la participación de la mitocondria llamada forma extrínseca. En ambos casos, el resultado final es la activación de un conjunto de proteasas denominadas **caspasas**. Dichas moléculas deben su nombre a ser cisteín proteasas específicas de ácido aspártico (Asp). Las caspasas están altamente conservadas en la evolución y pueden ser encontradas desde humanos [donde existen 13 caspasas (Nicotera y Melino, 2004)], pasando por insectos y nematodos hasta la hidra (Bottger y Alexandrova, 2007; Budihardjo y cols., 1999; Katoch y cols., 2002). Se expresan como proenzimas sin actividad biológica que tienen que activarse para poder ejercer su acción. Contienen tres dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande que contiene el centro activo con una cisteína dentro de un motivo conservado, y una subunidad pequeña en el C-terminal. Las caspasas son unas de las proteasas más específicas que ejercen su acción cortando tras un residuo de Asp (Stennicke y Salvesen, 1998). El predominio y la subunidad grande están separados por un lugar de corte con Asp, y la subunidad grande está

separada de la pequeña por uno o dos motivos de corte en Asp. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración se relaciona con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación; esta característica las separa en dos grupos (Kuranaga y Miura, 2007): las denominadas iniciadoras (activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores) y las ejecutoras (activadas mediante el corte específico por parte de las caspasas iniciadoras).

Las caspasas iniciadoras difieren según el tipo de vía; en la forma intrínseca, la iniciadora es la caspasa-9, mientras que en la vía extrínseca son las caspasas -8 y-10 (Nagata, 1997).

La vía **extrínseca** se inicia con la unión de un ligando [correspondiente a la familia de TNF] a receptores pertenecientes a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) (Gupta, 2003). La mayoría de estos receptores activan una cascada de señales que incluyen a NF- κ B y proteínas-quinasas (Liu y cols., 1996). Entre los miembros de esta familia nos encontramos diversas funciones como intervenir en la respuesta inflamatoria como son los receptores CD27, CD30 y CD40 (Smith y cols., 1994), o intervenir en procesos apoptóticos como Fas (ácido graso sintasa) y TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF) (Falschlehner y cols., 2007).

Otra característica importante de estos receptores es que poseen un dominio denominado DD (dominio de muerte) en su cola citoplasmática esencial para iniciar la apoptosis.

Tras la unión del ligando al receptor, éste se oligomeriza y recluta formando un complejo a moléculas adaptadoras y caspasas iniciales. Dicho complejo recibe el nombre de DISC (complejo señalizador inductor de la muerte), que producirá la activación de las caspasas iniciales que pertenecen al complejo (Gupta, 2003). Estas caspasas activarán a las caspasas efectoras -3,-6 y -7 que se unirán a diversas moléculas diana produciendo los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis.

Según el miembro de la familia de TNFR que actúa en el proceso de apoptosis, las proteínas implicadas son diferentes. Las diferentes rutas activadas son mediadas por Fas y TNFRI y II.

En la ruta activada por Fas (CD95), se recluta una proteína adaptadora llamada FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que interacciona con el DD de CD95 y se une a la procaspasa-8 (llamada Flice) para formar el complejo DISC que se encarga de iniciar la activación enzimática. Existe una regulación en esta ruta llevada a cabo por una proteína denominada FLIP (proteína inhibidora de flice). La sobreexpresión de ésta genera ventajas a las células tumorales ya que confiere resistencia a la apoptosis. En el caso de células de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) se ha visto que la sobreexpresión de FLIP protege a estas células de la apoptosis y puede contribuir con ello a la patogénesis (Oyarzo y cols., 2006). FLIP es diana de drogas que consiguen disminuir su expresión, como el taxol, que mediante la disminución de la expresión de c-FLIP induce en células humanas de leucemia apoptosis celular (Day y cols., 2006).

En la ruta activada por TNFR, el ligando (TNF) se une a dos tipos de receptores: TNFR-I y TNFR-II. En ese momento se produce la unión de la proteína TRADD (dominio de muerte asociado a TNFR) y también de FADD. Con esta última proteína se producirá la unión y posterior activación de la procaspasa-8, como sucedía con los receptores Fas.

TNFR-II juega un papel importante en la regulación de la apoptosis a través de TNFR-I (Gupta, 2003) y en las reacciones inmunológicas e inflamatorias como la activación de células T y miofibroblastos (Theiss y cols., 2005; Valencia y cols., 2006). Recientemente se ha visto que TNFR-II expresado en células del sistema inmune innato del huésped es suficiente para mediar el efecto antitumoral de TNF mediante la intervención de NO (Zhao y cols., 2007) .

La mayoría de la muerte celular en vertebrados sucede por la ruta mitocondrial (vía **intrínseca**) (Green y Kroemer, 2004). Dicha ruta comienza con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) que representa “ el punto de no retorno” de la muerte celular (Green y Kroemer, 2005). MOMP tiene como consecuencia el escape de proteínas del espacio intermembrana al citosol. Entre dichas proteínas se encuentra el citocromo c que interactúa en el citosol con la proteína monomérica APAF-1 (factor activador de apoptosis 1), provocando un cambio conformacional en ésta, llevando a su oligomerización y a la unión con la procaspasa-9. Dichas proteínas junto con ATP/ADP forman el apoptosoma, e inducen la activación autocatalítica de la caspasa-9, que una vez ya es funcional, activa las caspasas efectoras -3 y -7 (Green, 2005). La fosforilación de la caspasa-9 mediante la vía celular de las proteínas MAPK está asociada a la inhibición de la activación de dicha caspasa (Allan y cols., 2003). Recientemente se ha visto que la caspasa-9 se

encuentra fosforilada frecuentemente en carcinomas gástricos; dicha fosforilación resulta ser un mecanismo que provoca resistencia a la apoptosis en dichos tumores (Yoo y cols., 2007).

La MOMP también puede producirse mediante la actividad de proteínas proapoptóticas pertenecientes a la familia de Bcl-2 (como son Bax y Bak). La mayoría de estas proteínas controlan MOMP en la membrana externa.

También existen proteínas antiapoptóticas dentro de la familia de Bcl-2; como Bcl-2/Bcl-xL, que actúan como moléculas antiapoptóticas de dos formas: bloqueando la salida de citocromo c y uniéndose a Apaf-1 para prevenir la activación de la caspasa 9 (Zornig y cols., 2001).

Existen otras moléculas liberadas por la mitocondria ante un estímulo apoptótico, como Smac/Diablo que se unen a proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs) impidiendo que actúen (Du y cols., 2000; Verhagen y cols., 2000). Smac/Diablo incrementa su efecto proapoptótico mediante la interacción con la proteína TRAF3 vía el dominio TRAF (Zhang y cols., 2007).

La liberación de los factores proapoptóticos también puede darse como consecuencia de la permeabilización mitocondrial transitoria; en este caso lo que sucede es que los canales de la membrana mitocondrial interna se abren para permitir el movimiento de solutos e iones produciendo una pérdida de la funcionalidad de la membrana y un hinchamiento (*swelling*) de la matriz.

En la permeabilidad mitocondrial transitoria están implicados el transportador nuclear de adenosina (ANT) en la membrana mitocondrial interna y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana

externa, que forman, junto con otras proteínas, el PTPC (Brenner y Grimm, 2006).

La entrada en apoptosis de una célula puede deberse a otras alteraciones metabólicas como son la generación de radicales libres derivados del oxígeno o el aumento de calcio intracelular. Las mitocondrias son generadores primarios de radicales libres (Boveris y Chance, 1973) e importantes depósitos intracelulares de calcio (Gunter y Pfeiffer, 1990). Estos cambios bioquímicos que disparan el fenómeno de la apoptosis, pueden tener su origen en las alteraciones de la función mitocondrial.

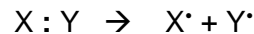
Otros mecanismos se asocian con una alteración del microambiente celular, producido, por ejemplo, por la inducción de MIC-1 (un factor de crecimiento transformante- β similar a citokina) e IGF-BP3 [proteína de unión a IGF (factor de crecimiento tipo insulina)]. Probablemente el cambio más determinante sea que una proporción de p53 estabilizada (es decir fosforilada) se encuentre en la membrana mitocondrial. Parece ser que esta localización de p53 se produce solamente si está induciendo la muerte celular más que la detención del ciclo. De hecho se ha observado como variantes de la p53 fisiológica, modificadas para que tuvieran como diana la mitocondria, en ausencia de señales nucleares eran capaces de inducir apoptosis (Rich y cols., 2000).

3. Radicales libres y cáncer.

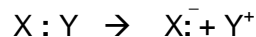
Los radicales libres son especies químicas muy reactivas que poseen un electrón desapareado. Son producidos constantemente en la célula tanto de forma “accidental” (co-productos del metabolismo) como de forma deliberada durante, por ejemplo, la fagocitosis. Diferentes sistemas enzimáticos han evolucionado para contrarrestar el daño generado por estos radicales. A pesar de la defensa antioxidante, el daño sobre las proteínas y el DNA, acumulado a lo largo de la vida, está implicado en la fisiopatología de distintas enfermedades como, la arteriosclerosis, la artritis, la fibrosis pulmonar, enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (Ames y cols., 1993; Halliwell y cols., 1992).

La formación de radicales libres puede deberse a tres mecanismos generales:

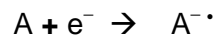
- **Rotura homolítica:** rotura de un enlace covalente de una molécula normal, de forma que cada uno de los fragmentos retiene un electrón del par apareado.



- **Rotura heterolítica:** pérdida de un electrón.



- **Transferencia electrónica:** adición de un electrón.



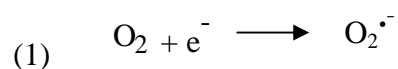
La transferencia electrónica es la más común en los sistemas biológicos ya que la fisión homolítica requiere una gran cantidad de energía, la cual puede proceder de elevadas temperaturas, luz ultravioleta o radiación ionizante. La fisión heterolítica, en la que los electrones del enlace covalente son retenidos por uno sólo de los fragmentos, no produce radicales libres sino iones cargados (Cheeseman y Slater, 1993).

Los radicales reactivos responsables del daño tisular son, generalmente, especies de vida media muy corta generadas *in situ* a partir del metabolismo celular normal (respiración mitocondrial, reacciones de hidroxilación, procesos inflamatorios), xenobióticos o radiaciones ionizantes. Una característica importante que distingue las reacciones de los radicales libres del resto de reacciones metabólicas es que, las primeras, tienen como resultado la formación de nuevos radicales, dando lugar a una reacción en cadena que amplifica su alcance (Dreher y Junod, 1996).

3.1. Especies reactivas del oxígeno.

Los radicales más importantes en los sistemas biológicos son los radicales libres del oxígeno (ROS). Los ROS tienen capacidad de producir efectos citotóxicos, aunque, conforme se conocen sus mecanismos de acción, va cobrando una mayor importancia su función en la señalización celular tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas; este es el caso de dos tipos de ROS, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), implicados en la fosforilación y desfosforilación de numerosas proteínas mediadas por proteínas quinasas y fosfatasa (Afanas'ev, 2006); son generados por mitocondrias de células del endotelio vascular y están implicadas en diferentes rutas de señalización celular (Zhang y Gutterman, 2007) o por intervención de estrógeno y están implicados en el crecimiento de las células endoteliales (Felty, 2006). La acción de los ROS en las células es compleja y depende de diferentes factores como su concentración (Burdon y cols., 1995), el tipo celular y su estado metabólico, o una combinación de los factores anteriores. En un reciente estudio se ha observado cómo 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).

La reducción del oxígeno (1) mediante transferencia de un electrón, produce el anión superóxido.

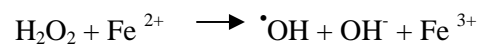


Una reducción por ganancia de dos electrones en el oxígeno molecular puede generar H₂O₂. En los sistemas biológicos dos moléculas de O₂^{•-} pueden reaccionar juntas para formar H₂O₂ más oxígeno molecular. En esta reacción de dismutación no se producen radicales, y puede darse espontáneamente o mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Cheeseman y Slater, 1993).

H₂O₂ no es un radical libre, pero es un componente importante en la bioquímica de los radicales libres. Puede descomponerse fácilmente, sobretodo en presencia de iones metálicos, produciendo radical hidroxilo (•OH). A diferencia del H₂O₂, el •OH puede infligir daño directo en DNA, lípidos y proteínas. Es el radical oxidante más potente con una vida biológica extremadamente corta y su difusión limitada, causando gran daño alrededor del sitio de producción (Cheeseman y Slater, 1993). Se ha visto que es posible reducir selectivamente al radical •OH mediante la utilización de hidrógeno molecular, que no reacciona con otro ROS, sugiriendo que el hidrógeno molecular se puede utilizar como una terapia antioxidante efectiva (Ohsawa y cols., 2007).

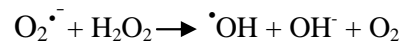
La reacción que se produce al descomponerse H₂O₂ es conocida como reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro (2), pero puede darse de forma no catalizada (3) si O₂^{•-} reacciona directamente con H₂O₂ (Cheeseman y Slater, 1993; Klaunig y Kamendulis, 2004).

Reacción de Harber-Weiss



Catalizada (2)

Reacción de Harber-Weiss



No catalizada (3)

Bajo circunstancias normales la principal fuente de radicales libres se encuentra localizada en la mitocondria. El oxígeno es reducido por la citocromo oxidasa en un 98-99%, mientras que el 1-2% restante produce H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Cadenas y cols., 1977). La velocidad de producción de H_2O_2 por mitocondrias aisladas depende del estado metabólico mitocondrial. En un primer paso, la reducción del oxígeno por transferencia de un electrón produce $\text{O}_2^{\bullet-}$ (1). La reacción de dos moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ da lugar a H_2O_2 . Como se ha comentado antes, esta reacción puede darse espontáneamente o vía superóxido dismutasa; en los sistemas biológicos se lleva a cabo preferentemente vía enzimática.

Otro radical que se puede generar es el hidropéroxido (HO_2^{\bullet}) por protonación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a valores de pH bajos; es una especie muy reactiva pero a pH fisiológico menos de un 1% es protonado.

3.1.1. Reacciones dañinas de los ROS en las células.

Los ROS pueden producir diferentes efectos sobre el DNA: 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 $^{\bullet}\text{OH}$ es el que mayores lesiones confiere al DNA, ya que puede reaccionar con todos sus componentes (Halliwell, 2007). La alteración química de las moléculas de desoxirribosa puede producir la pérdida de bases de purina o pirimidina,

originándose focos mutagénicos *in vivo* (Loeb, 1985). Algunos de los productos más importantes que se forman por ataque del $\cdot\text{OH}$ sobre las bases púricas del DNA son la 8-hidroxi-guanosina (8-OH-Gua) , estudiada por ejemplo en la carcinogénesis de mama (Nyaga y cols., 2006), o la 5-formamido-4,6-diamino-pirimidina. Ejemplos de productos derivados de las pirimidinas son el tiamino glicol y la 5-hidroxi-citosina (8-OH-Cyt) (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-Gua, por oxidación del C8 de la guanina, que ocurre en aproximadamente uno de cada 10^5 residuos de guanina en una célula humana normal (Kasai y cols., 1986). La 8-OH-Gua puede producir un cambio del apareamiento GC por TA, debido al apareamiento erróneo 8-OH-Gua-Ade. 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, en cánceres de hígado y pulmón (Hsu y cols., 1991; Takahashi y cols., 1989).

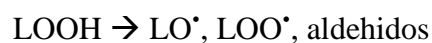
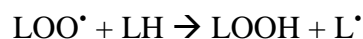
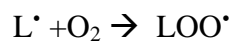
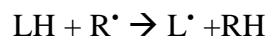
También se ha observado que las mitocondrias pueden sufrir daño oxidativo en su DNA (Indo y cols., 2007). En la carcinogénesis, se ha visto daño del DNA mitocondrial producido por ROS (Cavalli y Liang, 1998), de hecho, mutaciones en el DNA mitocondrial y alteraciones en la función genómica parecen estar relacionados con el desarrollo del cáncer. Se han identificado mutaciones en el DNA mitocondrial en distintos tumores (Horton y cols., 1996; Tamura y cols., 1999), y sabemos que el genoma mitocondrial parece ser más susceptible que el nuclear al daño oxidativo

(Zastawny y cols., 1998). La susceptibilidad del DNA mitocondrial a los ROS se ve incrementado por tres factores: el DNA mitocondrial se encuentra muy próximo a la mayor fuente generadora de ROS, la cadena de transporte de electrones; el DNA mitocondrial no está protegido por histonas; y la reparación del DNA mitocondrial es reducida (Klaunig y Kamendulis, 2004).

La generación de ROS inducidos por iones metálicos, a parte de dañar el DNA, daña otros componentes celulares como los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos (PUFA), que son muy sensibles a la oxidación (Marnett, 1999). Hay casos donde existen moléculas más sensibles que los PUFAs a la oxidación como por ejemplo el colesterol de la membrana de eritrocitos humanos (Liu y Shan, 2006).

Ya en los años ochenta se confirmó, mediante experimentos con hierro *in vivo*, el incremento de la oxidación de PUFAs en la mitocondria hepática y una fragilidad lisosomal (Bacon y cols., 1983).

El mecanismo general de peroxidación lipídica puede resumirse de esta forma:



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^{\bullet} . Los LOOH pueden originar más especies radicalarias y ampliar el rango de compuestos, sobretodo a aldehídos (Cheeseman y Slater, 1993).

Los LOO^{\bullet} pueden cambiar a endoperóxidos y estos formar malondialdehído (MDA) (Marnett, 1999), como sucede en el caso de carcinoma de próstata (Surapaneni y Venkata, 2006). Se ha observado, en ensayos con linfoma murino, como el MDA y los dímeros MDA-MDA tienen actividad mutagénica (Riggins y Marnett, 2001). También se ha observado como los aductos MDA-DNA parecen ser promutagénicos ya que inducen mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Klaunig y Kamendulis, 2004).

El aldehído que se produce mayoritariamente con la peroxidación lipídica, a parte de MDA, es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). HNE es débil mutagénicamente pero es el producto más tóxico de la peroxidación lipídica (Valko y cols., 2006).

3.2. Óxido nítrico y especies reactivas del nitrógeno. Generalidades.

El óxido nítrico (NO), molécula gaseosa no cargada, es un radical libre ya que posee un electrón desapareado.

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. En el medio extracelular, NO reacciona con oxígeno y H₂O para formar iones nitrato y nitrito.

A concentraciones bajas, NO actúa como una molécula de señalización en muchos procesos fisiológicos como son la regulación de la liberación de neurotransmisores; la participación en la citotoxicidad mediada por macrófagos y neutrófilos (Rodrigo y cols., 2000); y en linfocitos T donde participa en la respuesta inducida tras el reconocimiento del antígeno (Ibiza y cols., 2006); en la regulación de la presión sanguínea, relajación y viabilidad de células del músculo liso, ...(Bergendi y cols., 1999; Liu y cols., 2007). A concentraciones muy elevadas puede dañar el DNA, RNA (ácido ribonucleico), lípidos y proteínas. 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).

La sobreproducción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) se denomina estrés nitrosativo (Klatt y Lamas, 2000; Ridnour y cols., 2004).

El estrés nitrosativo conduce a reacciones de nitrosilación que pueden alterar la estructura de proteínas e inhibir con ello su función normal.

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 (Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida) y oxígeno molecular; y como cofactores: FAD (Flavín adenín dinucleótido) y FMN (mononucleótido de flavina). Su actividad enzimática puede ser incrementada por otro cofactor, la tetrahidrobiopterina (Knowles y Moncada, 1994; Yamamizu y cols., 2007).

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 iNOS es inducida por algunas citocinas y mediadores de la inflamación como diferentes interleukinas (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 (Katoch y cols., 2002), 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 oxígeno (Dzurik y cols., 2006) y energía en los tejidos y quizás, con la señalización intramitocondrial que desencadena el proceso de apoptosis o muerte celular programada.

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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ (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).

3.2.1. Reacciones dañinas de los RNS en las células.

Las reacciones más características en la formación de RNS se muestran a continuación (Rodrigo y cols., 2000):

- Dióxido de nitrógeno (NO_2) $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$
- Tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4) $\text{NO}_2 + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_4$
- Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) $\text{NO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$

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:

- Nitrito (NO_2^-) $[\text{NO}^+] [\text{NO}_2^-] + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$
- Nitrito (NO_2^-) $[\text{NO}^+] + \text{OH}^- \rightarrow \text{HNO}_2 \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_2^-$
- Nitrito (NO_2^-) y Nitrato (NO_3^-) $[\text{NO}^+] [\text{NO}_3^-] + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+$
- S-nitrosotiol $\text{RSH} + [\text{NO}^+] \rightarrow \text{RSNO} + \text{H}^+$

El NO al reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ genera peroxinitrito ($^-\text{OONO}$) (Hibbs y cols., 1988). Como se ha indicado anteriormente la SOD es el mecanismo de eliminación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La reacción entre el NO y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ establece una competencia entre el NO y la SOD por el $\text{O}_2^{\cdot-}$, de forma que se puede producir la formación de $^-\text{OONO}$ en lugar de H_2O_2 .



En condiciones fisiológicas el ácido peroxinitroso (HOONO) es tan reactivo como los radicales hidroxilos (Pryor y Squadrito, 1995). El peroxinitrito está considerado como uno de los más potentes oxidantes biológicos (Schopfer y cols., 2000).

Los RNS pueden dañar y matar células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria (Brown,

1999), daño a proteínas y a lípidos (Berlett y Stadtman, 1997; Prescott, 1999; Steinberg, 1997; Tien y cols., 1999), inhibición de síntesis proteica o de DNA (Bundy y cols., 2000; Kim y cols., 1998), depleción de GSH (glutación reducido) o de ATP (Pieper y cols., 1999).

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).

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 y c) inhibición de los sistemas responsables de la reparación del DNA dañado por otras sustancias genotóxicas. Además, algunos 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 ^-OONO , capaces de alterar al DNA y producir una gran variedad de daños moleculares (Wink y cols., 1996).

3.3. Efectos de los radicales libres sobre los tumores.

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 los ROS tienen capacidad de inducir tanto la proliferación (Burdon, 1995) como la muerte celular (Slater y cols., 1995).

Por ejemplo, el peroxinitrito activa la vía de señalización de JNK vía MEKK1 y MKK4, activando mecanismos de muerte celular (Dong y cols., 2007). En células C6 de glioma se ha relacionado la reducción de oxidantes (mediante la utilización de N-acetilcisteína) con una inhibición de la proliferación celular (Tassone y cols., 2007). En estudios con las células PC-12-D (2) R se observó que la activación de ERK produce la transcripción de genes de supervivencia y las células son capaces de mantener su homeostasis. En las que se activa p53, se activa la caspasa 3, cuyo resultado es la muerte celular por apoptosis. La decisión de sobrevivir o morir es muy temprana tras la exposición al estrés oxidativo (Nair y cols., 2004).

Se ha observado que dosis subletales de agentes moduladores del status redox celular, como el peróxido de hidrógeno, antimicina, diamina o BCNU, sensibilizan a los hepatocitos primarios para entrar en apoptosis bajo la estimulación de TNF (Han y cols., 2006a).

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 los ROS estimulan la proliferación celular

tumoral puede ser, 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 proteína quinasa c (PKC) y la 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, , 1989). Los radicales libres también pueden modular directamente la proliferación celular (Tassone y cols., 2007). Por ejemplo, los ROS pueden alterar la actividad de la PKC por oxidación de residuos de cisteína en el centro activo de la enzima (Gopalakrishna y Anderson, 1989).

Los ROS tienen la capacidad de inducir la transcripción de genes específicos. Entre los factores de transcripción mejor estudiados en la respuesta al estrés oxidativo se encuentran: AP-1 (proteína activadora -1) y NF- κ B, aunque se han encontrado otros factores como Ets, Smad y Snail.

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 proteína quinasa C y reguladores de la homeostasis redox intracelular (Arrigo, 1999). La inducción de AP-1 por H_2O_2 , metales, citokinas y otros productos, está mediada por miembros de la familia de MAP quinasas: JNK y p38 (Aggeli y cols., 2006; Chang y Karin, 2001).

Recientemente, el factor Ets-1 se ha visto asociado a la progresión de varios tipos de cánceres humanos (Feldman y cols., 2003; Hahne y cols.,

2005; Seth y Watson, 2005). Ets-1 puede que regule la metaloproteasa MMP-9, diana de TGF- β 1 y TPA mediante la ruta de proteínas MAPK. Ets-1 puede estar regulado por H₂O₂ mediante un elemento de respuesta antioxidante en el promotor sugiriendo un papel potencial en la progresión tumoral guiada por ROS (Wilson y cols., 2005).

NF κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes en células eucariotas y participa en la respuesta inmune, al estrés, a la inflamación y a la apoptosis (Jang y Surh, 2003). Normalmente, NF- κ B forma dímeros en el citosol unidos a las proteínas inhibitoras I κ B, y se activan si algún estímulo es capaz de fosforilar y provocar la proteólisis de I κ Bs. Una vez NF- κ B se libera de I κ B, entra en el núcleo e induce la expresión de grupos de genes. Se ha observado como la sobreexpresión de NF κ B suprime la inducción de apoptosis con lo que se facilita la supervivencia celular (Foo y Nolan, 1999). Esta supresión está ligada a una regulación de Bcl-xL y A1/Bfl-1, homólogo inactivo catalíticamente de FLIP, el inhibidor de catepsina Spi2A y a la combinación de TRAF1/2 con el inhibidor de proteínas apoptóticas IAP1/2 (Kucharczak y cols., 2003).

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 catalasa (CAT), SOD y GPx está mediado parcialmente por NF- κ B (Jang y Surh, 2003).

La apoptosis inducida por NO acompaña muchas veces una acumulación del gen supresor de tumores *p53*, cambios en la expresión de miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de *bcl-2*, activación de proteasas “caspasas-3-like” y translocación del citocromo c (Brune y cols.,

1999; Messmer y Brune, 1996; Wang y cols., 2007). La translocación del citocromo c sugiere que la apoptosis inducida por NO está mediada normalmente por la mitocondria, pero en algunos tipos celulares como en el neuroblastoma y en las células HL-60, se observa una activación temprana de las caspasas 8 y 2, indicando que en estos casos el proceso se dispara por vías no mitocondriales (Moriya y cols., 2000; Yabuki y cols., 2000)

4. Sistemas de defensa contra los radicales libres.

4.1. Defensa enzimática: SOD, CAT Y GPx.

Los principales sistemas de defensa contra los radicales libres los constituyen las enzimas antioxidantes siguientes: **SOD**, **GPx** y **CAT** (Yu, 1994)(figura 5).

La **SOD** cataliza la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Éste es detoxificado por la **CAT** mediante una reacción rédox cuyos productos son H_2O y O_2 . La **GPx** reduce tanto H_2O_2 como hidroperóxidos orgánicos, utilizando GSH como dador de electrones. En ausencia de estrés oxidativo, los ROS que se generan, se mantienen a niveles muy bajos gracias a la acción coordinada de estas tres enzimas. Tanto un descenso en la capacidad antioxidante como la sobreexpresión unilateral de una de estas tres enzimas, puede aumentar la vulnerabilidad de la célula a los radicales libres (Dreher y Junod, 1996).

- Catalasa:

Se encuentra en el peroxisoma y promueve la conversión del H_2O_2 a H_2O y O_2 . Una molécula de CAT puede convertir 6 millones de moléculas de H_2O_2 en agua y oxígeno cada minuto (Valko y cols., 2006).

- Glutación peroxidasa:

Es una selenoproteína tetramérica (Behne y Kyriakopoulos, 2001) que reduce tanto H_2O_2 como hidroperóxidos orgánicos, utilizando GSH como dador de electrones. Está ubicada tanto en el citosol como en la

mitocondria, siendo mayoritariamente mitocondrial (Lawrence y Burk, 1976).

- Superóxido dismutasa:

Cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot -}$ a O_2 y H_2O_2 . Aunque esta enzima se aisló en 1939, no fue hasta 1969 cuando McCord y Fridovich probaron la actividad antioxidante de la SOD (McCord y Fridovich, 1969). Existen diversas formas de SOD, según la naturaleza del centro activo metálico y la constitución aminoacídica. En humanos podemos encontrar tres formas de SOD: la citosólica (Cu/Zn-SOD), la mitocondrial (Mn-SOD) y la extracelular (EC-SOD). La primera es una molécula de 32 KDa que está compuesta de dos subunidades idénticas (homodímeros). Cada subunidad contiene, como sitio activo, un cluster metálico compuesto por zinc y cobre. La SOD mitocondrial Mn-SOD es un homotetrámero de 96 KDa que contiene un átomo de manganeso por subunidad. Esta enzima cicla el Mn de su forma oxidada Mn (III) a la forma reducida Mn (II) y vuelve a Mn (III) durante el segundo paso de dismutación del superóxido.

Estudios en el 2000 indicaron que la SOD podía ser una diana factible para inducir la muerte selectiva de células cancerosas y que, la combinación de un mecanismo basado en inhibidores de SOD con agentes que producen radicales libres, podía tener aplicaciones clínicas (Huang y cols., 2000). De hecho, un estudio publicado en el año 2002 demuestra que, con la combinación de un oligonucleótido antisentido anti-SOD (se consigue disminuir la expresión de la enzima bloqueando su mensajero) con un mimetizador de la SOD [cis-FeMPy(2)P(2)P o 5,10-bis(N-metil-4-piridil)-15,20-difenil]porfinaoion], mueren selectivamente células tumorales y no las normales, generando mayor citotoxicidad en las

primeras (Asayama y cols., 2007). Por todo esto, se puede utilizar a SOD como una enzima diana para aumentar la muerte celular inducida por moléculas como cis-FeMPy(2)P(2)P (Asayama y cols., 2007).

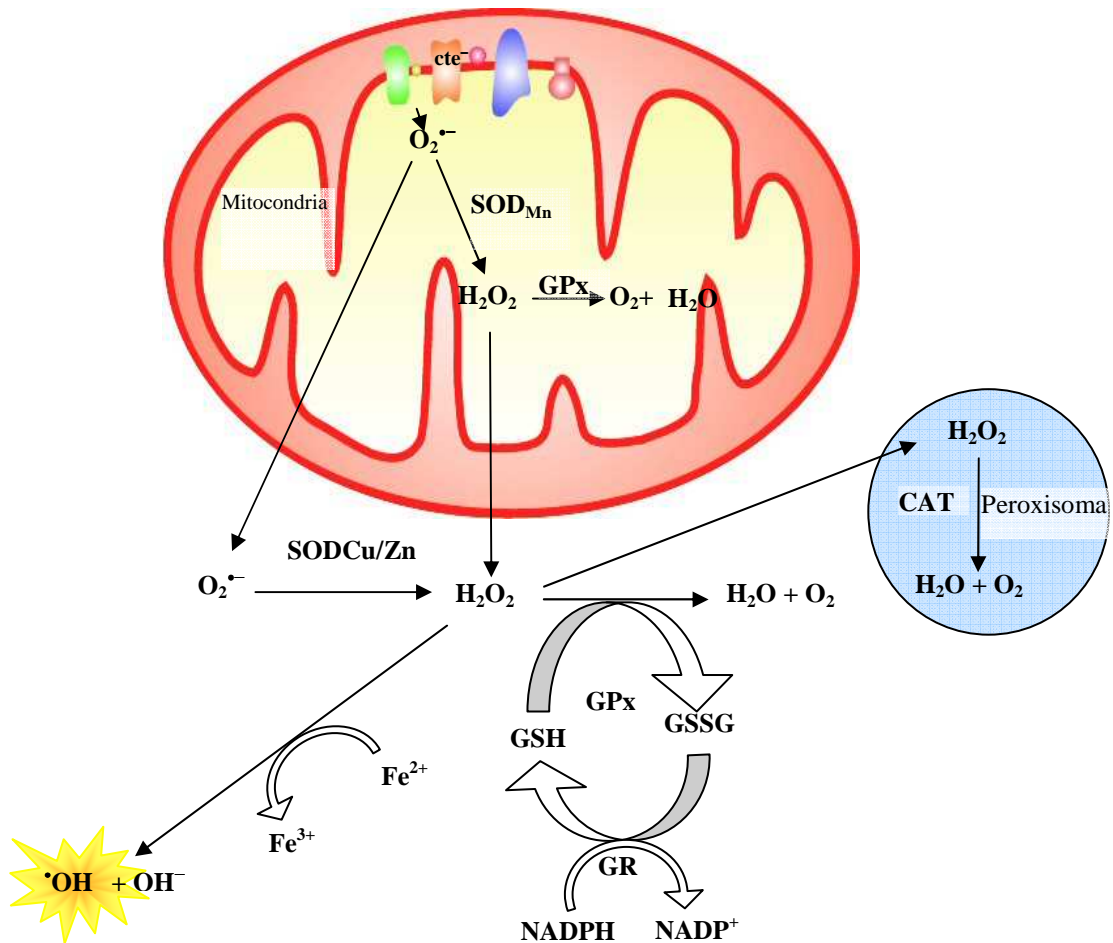


Figura 5. Producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y defensas antioxidantes.

4.2. Defensa no enzimática: papel de los tioles no proteicos.

4.2.1. Conceptos generales.

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen la primera línea defensiva frente a los radicales libres tanto extracelulares como intracelulares. Estos antioxidantes celulares pueden ser moléculas lipófilas [por ejemplo, la bilirrubina, (Mancuso y cols., 2006)], hidrófilas [como el GSH o el ácido úrico, (Foksinski y cols., 2007)] o componentes de las proteínas (por ejemplo, el grupo sulfhidrilo de la cisteína).

Dentro de las defensas no enzimáticas, tienen un papel importante los tioles no proteicos, de los que el **glutatión** (GSH, L- γ -glutamil cisteinil glicina) es el más abundante en las células de mamífero.

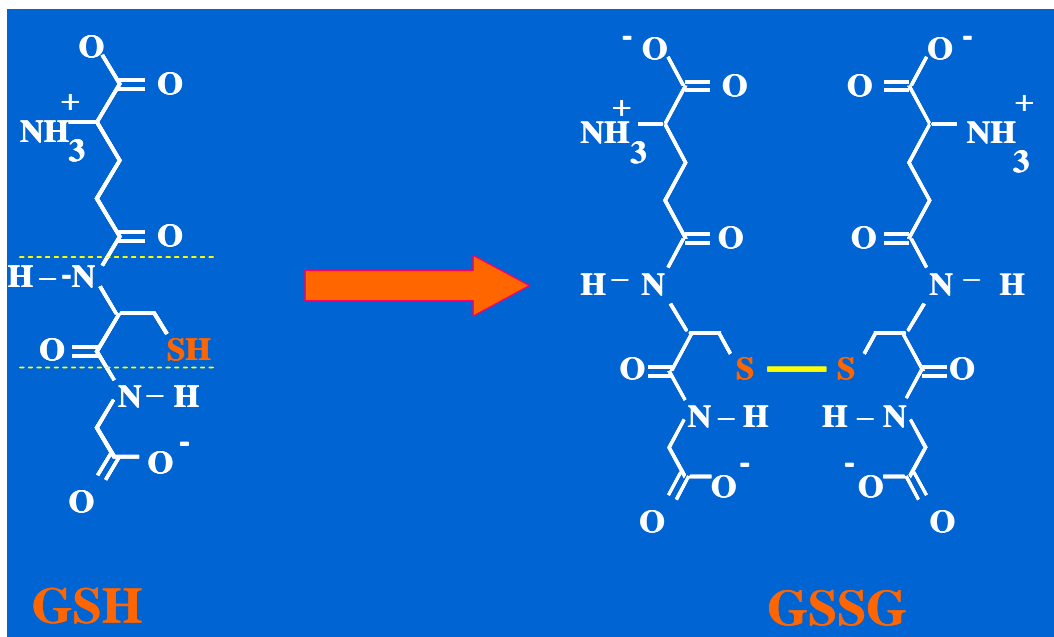


Figura 6. Estructura del glutatión reducido y oxidado.

Este tripéptido puede aparecer, según su estado redox, en forma de GSH o de glutatión oxidado (GSSG) por unión de dos moléculas de GSH mediante un puente disulfuro entre las cisteínas (figura 6). El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, una de ellas es la de proteger a la célula frente a los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones (Sies, 1991). Muchas de estas funciones se deben a su peculiar estructura química. El grupo tiol (-SH) de la cisteína es el que interviene en las reacciones redox, mientras que el enlace γ -glutamilo entre la glutamina y la cisteína le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) localizada en la membrana celular (Meister y Anderson, 1983). El conjunto de las reacciones enzimáticas que participan en la síntesis y degradación del GSH constituye el llamado **ciclo del γ -glutamilo** (Meister y Anderson, 1983) (figura 7).

En la síntesis de GSH intervienen dos enzimas. La primera es la γ -glutamilcisteína sintetasa [también denominada por muchos autores como glutamato-Cisteína ligasa (Diaz y cols., 2002)], que da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir de L-glutámico y L-cisteína. En situaciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de GSH es la disponibilidad de cisteína (Tateishi y cols., 1977; Tateishi y cols., 1974). La síntesis de GSH está regulada por retroalimentación negativa, ya que el GSH inhibe la γ -glutamilcisteína sintetasa (Richman y Meister, 1975). El segundo paso de la síntesis de GSH (figura 5, reacción 2) está catalizado por la GSH sintetasa, que une una glicina a la γ -glutamil cisteína. El GSH sintetizado intracelularmente es transportado al exterior celular (reacción 3).

La degradación del GSH a sus aminoácidos constituyentes la cataliza γ -GT y la cisteinil-glicina dipeptidasa. La γ -glutamil transpeptidasa cataliza 2 tipos de reacciones:

- 1) Reacción de transpeptidación; en la que el γ -glutamilo se transfiere a un aceptor.
- 2) Hidrólisis del enlace γ -glutamilo.

La actividad γ -GT se localiza en la membrana plasmática de las células (Meister y Anderson, 1983), su *locus* activo se orienta al exterior celular. Cuando el GSH interacciona con la membrana, la γ -GT forma un γ -glutamil aminoácido, que entra al interior de la célula. La enzima γ -glutamil ciclotransferasa cataliza la liberación del aminoácido y la síntesis de 5-oxo-L-prolina. La oxoprolinasa cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina, lo cual libera glutamato para la síntesis de GSH. También son sustrato de la γ -GT los GSH-conjugados producidos por la reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (reacción 10). Dicha enzima cataliza las reacciones entre GSH y una amplia variedad de compuestos electrofílicos de origen exógeno, dando lugar a dichos GSH-conjugados (en el esquema el GSH y los GSH-conjugados son representados conjuntamente como γ -Glu-CysH(X)-Gly).

Una dipeptidasa hidroliza la cisteinilglicina formada por la γ -GT (Meister y Anderson, 1983). Existen diferentes mecanismos para el transporte de la cisteína y de equivalentes de cisteína al interior celular. El sistema ASC, mediante un transporte sodio dependiente, introduce cisteína extracelular (Bukowski y cols., 1995; Knickelbein y cols., 1997).

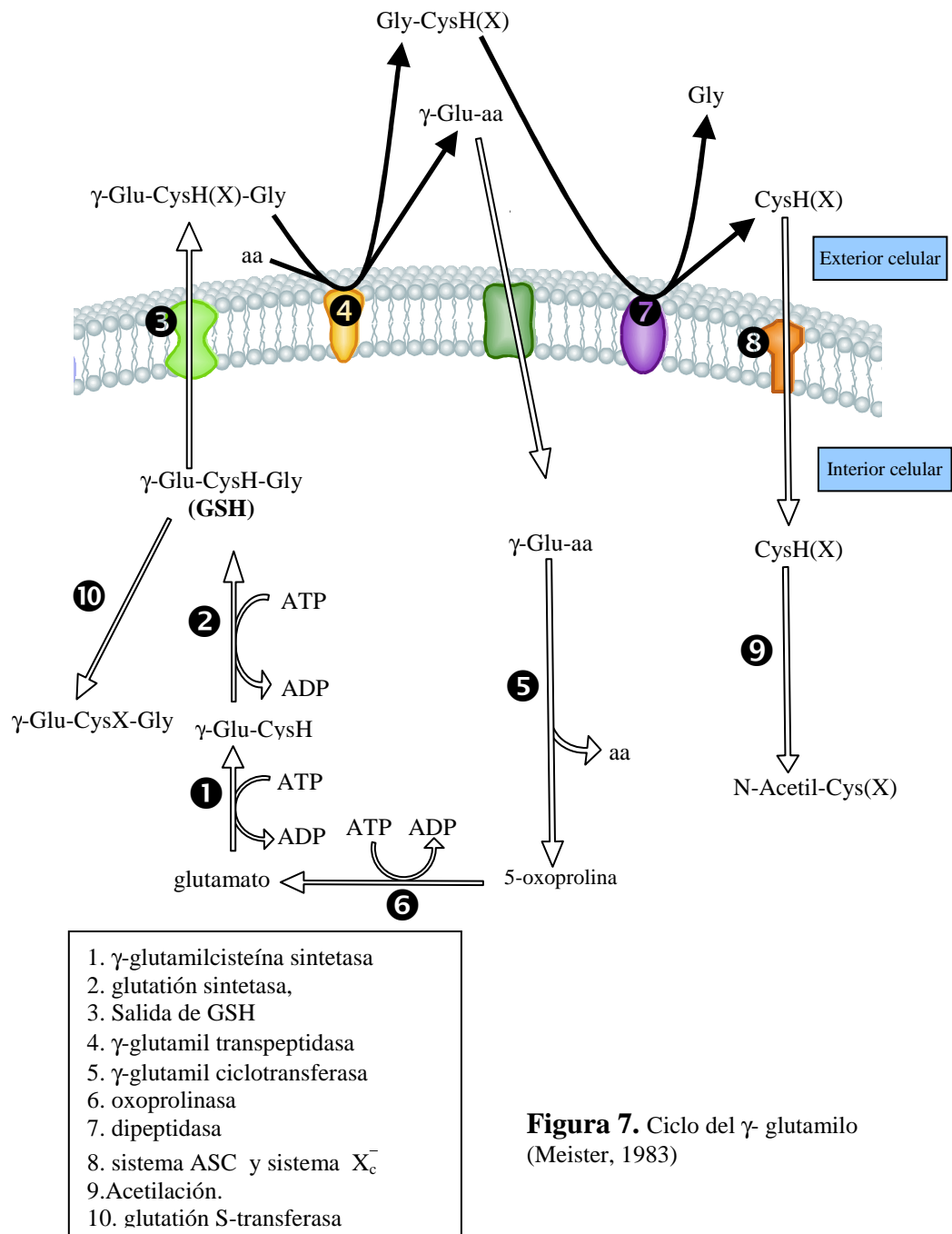


Figura 7. Ciclo del γ - glutamilo (Meister, 1983)

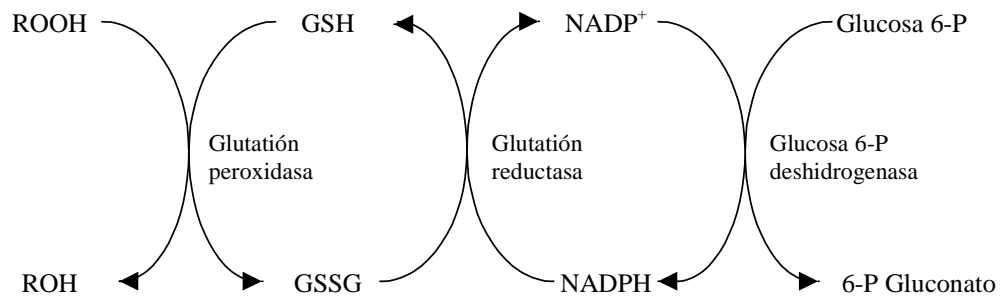


Figura 8. Ciclo redox del glutatión.

Debido a que los niveles de cistina en el medio extracelular son más elevados que los de cisteína libre, los sistemas biológicos han desarrollado un sistema sodio independiente, inducible, con un alto grado de especificidad para la cistina y el glutamato llamado sistema Xc^- (Deneke y cols., 1989; Knickelbein y cols., 1997; Li y cols., 1999; Sakakura y cols., 2007).

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna, o bien puede reducir los peróxidos por medio de la GPx, enzima clave del ciclo redox del glutatión (figura 8). En situación de estrés oxidativo, el GSH se oxida a GSSG el cual es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa (GR), utilizando NADPH como cofactor.

El GSH interviene en la síntesis de DNA (Estrela y cols., 2006). En este proceso se requiere la reducción de ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos, una reacción catalizada por la ribonucleótido reductasa. En esta reacción debe intervenir un donante de hidrógeno que puede ser la tiorredoxina o la glutarredoxina (Fernandes y Holmgren, 2004), dependientes de GSH. También está implicado en la detoxificación

de xenobióticos (Jones y cols., 1986), la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña y cols., 1989), es un reservorio de cisteína (Tateishi y cols., 1974), modula actividades enzimáticas (Pajares y cols., 1992), y regula la homeostasis del calcio (Bellomo y cols., 1982) y la proliferación celular (Terradez y cols., 1993).

4.2.2. GSH, proliferación tumoral y metástasis.

Los pacientes cancerosos en un estado avanzado de su enfermedad sufren frecuentemente caquexia, un síndrome que incluye anorexia, debilidad y pérdida de masa muscular (Skipworth y cols., 2007). En algunos casos, este hecho se asocia a una elevada tasa de síntesis proteica en el hígado. Estos cambios en el metabolismo proteico muscular, hepático y tumoral se estudiaron durante el crecimiento del tumor ascítico de Ehrlich en roedores (Estrela y cols., 1992). La tasa de síntesis proteica desciende en músculo esquelético y en el tumor, mientras aumenta en el hígado, al mismo tiempo que disminuye la tasa de proliferación celular.

El contenido en GSH de las células tumorales también varía, siendo mayores los niveles de GSH cuando las células tumorales proliferan activamente. Por el contrario, las concentraciones de GSSG en las células tumorales no cambian significativamente a lo largo del crecimiento tumoral. Esta ausencia de cambios del contenido de GSSG, *in vivo*, puede ser explicada, al menos en parte, por la liberación de GSSG al medio extracelular (Estrela y cols., 1992; Meister, 1983). El cambio observado en el cociente GSH/GSSG se debe, por lo tanto, al descenso del contenido en GSH. Para determinar las posibles razones de la variación observada en el estatus del GSH, se estudiaron las actividades GR, G6PDH, GPx y GSH-S-

transferasa, es decir, las principales enzimas relacionadas con el ciclo redox del GSH. Las actividades GPx y GSH-S-transferasa, enzimas que utilizan el GSH, aumentaron significativamente; mientras que las dos enzimas que regeneran el GSH, GR y G6PDH, no cambiaron significativamente (Estrela y cols., 1992). Estos cambios enzimáticos pueden explicar, en parte, el cambio oxidativo del par GSH/GSSG durante el crecimiento tumoral.

Estos hechos sugieren que las poblaciones celulares en estado de proliferación activa pueden requerir mayores niveles de GSH. Sin embargo, el crecimiento tumoral no afecta significativamente al contenido de GSH del resto de tejidos, a excepción de la sangre, donde sí se produce un descenso en el contenido eritrocitario de GSH (Terradez y cols., 1993). En tumores de proliferación rápida la cisteína, cuya concentración sanguínea es baja, es limitante para la síntesis de GSH y la proliferación celular (Ioannidis y de Groot, 1993; Meister, 1991). La sobreexpresión de γ -GT confiere a las células tumorales en crecimiento una gran ventaja a concentraciones fisiológicas de cist(e)ina (Hanigan, 1995). Además el flujo de GSH entre órganos se ha propuesto como un sistema de distribución de cisteína para la síntesis proteica y de GSH utilizado por tejidos con actividad γ -GT (Griffith y Meister, 1979).

En condiciones normales los niveles plasmáticos de cistina son mayores que los de cisteína y la cistina una vez transportada es convertida en cisteína en el interior celular (Bannai y Tateishi, 1986). Como ya se ha indicado la cistina es transportada por el sistema X_c^- (capta una molécula de cistina y libera una de glutamato) (Bannai y Tateishi, 1986). Cuando los niveles de glutamato extracelulares son elevados se inhibe el transporte; este hecho es frecuente en cánceres avanzados (Droge y cols., 1988). Al

disminuir la captación de cistina, las células tumorales utilizan a la γ -GT para generar cisteína a partir del GSH extracelular (Estrela y cols., 2006). De hecho tumores con elevados niveles de γ -GT tienen facilitada la síntesis de GSH (Griffith, 1999).

En estudios de finales de los noventa se observó la estrecha relación existente entre los niveles de GSH asociados al crecimiento celular con la actividad metastática, de hecho, células tumorales con un elevado contenido en GSH mostraban una mayor capacidad invasiva (Carretero y cols., 1999).

Se observaron, en estudios *in vitro* en células de B16M, niveles de GSH mucho mayores en placas de cultivo donde las células se encontraban a baja densidad (LDB16M) que en placas confluentes (HDB16M). Al inocular estas células intraesplénicamente en ratones, se observó que las células LDB16M tenían mayor capacidad metastática en el hígado que las HDB16M. Tratando las placas confluentes con éster de GSH, las células recuperaban tanto los niveles de GSH como la capacidad metastática de las LDB16M. Así mismo, tratando las placas de baja densidad celular con L-butionina-(S, R)-sulfoximina (BSO), se inhibía específicamente la síntesis de GSH y se disminuía la capacidad de metástasis (Carretero y cols., 1999).

Como ya se ha explicado previamente, el GSH intracelular protege a las células tumorales frente al efecto citotóxico de RNS y ROS (Ortega y cols., 2003b). De hecho, la resistencia a la radiación y a las drogas de algunos tumores está asociada con niveles celulares de GSH incrementados (Estrela y cols., 1995).

En estudios *in vitro* se observó cómo durante la interacción entre las células B16M y las del endotelio sinusoidal hepático (HSE), vía IL-1 y

su receptor, se activa la liberación de ROS/RNS y citokinas proinflamatorias por parte de las endoteliales. Estos radicales libres tienen un efecto citotóxico sobre las células más sensibles al estrés oxidativo/nitrosativo, es decir, las células de bajo contenido en GSH. Tras la eliminación del H_2O_2 por CAT exógena se observó como la citotoxicidad producida sobre las células metastáticas es inducida por NO y potenciada por el H_2O_2 , vía generación de especies altamente oxidantes como $ONOO^-$ y $\bullet OH$ (Carretero y cols., 2001). Las células que resisten a este estrés utilizan la inducción de IL-1 y H_2O_2 para expresar VLA-4 en su superficie, mediante la cual, se unirán a VCAM-1 (expresada en las células endoteliales tras el estímulo oxidativo/nitrosativo)(figura 9)(Marui y cols., 1993). De esta forma se establece una unión más firme entre ambos tipos celulares (Klemke y cols., 2007). Este puente molecular es necesario para potenciar la extravasación (Anasagasti y cols., 1998). Por todo lo expuesto, parece evidente que el GSH constituye un parámetro celular importante para la progresión metastática de las células de melanoma en este modelo murino.

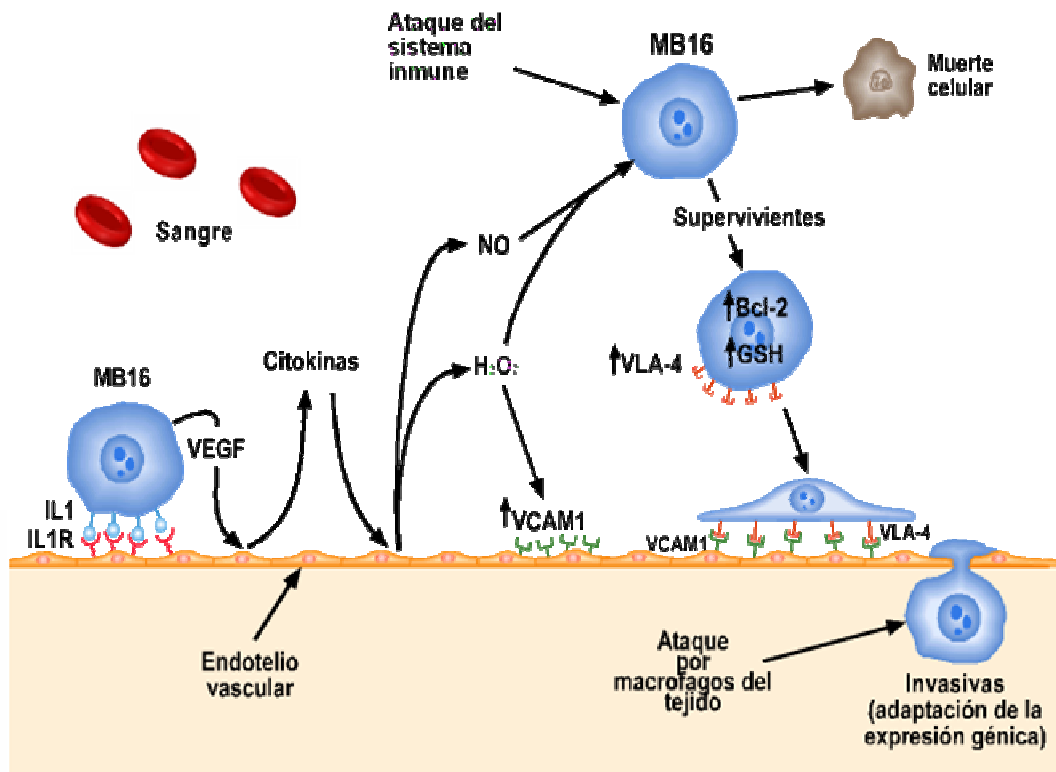


Figura 9. Interacción de las células metastáticas con el endotelio vascular.

5. Regulación de los niveles intracelulares de GSH y Bcl-2 en células tumorales: una posible estrategia para aumentar la eficacia de la terapia antitumoral.

Debido a la importancia del GSH en la protección frente a radicales libres, la modulación de los niveles de GSH puede contribuir a la destrucción selectiva de las células tumorales. De hecho, una disminución en los niveles de GSH o en su tasa de síntesis aumenta la sensibilidad frente a la radiación y a los fármacos citotóxicos (Arrick y Nathan, 1984; Meister, 1983); por el contrario, un aumento en la resistencia a la radiación y a agentes quimioterapéuticos, y con ello a la muerte celular, se asocia a elevados niveles de GSH en las células cancerosas (Meister, 1991) (Rosi y cols., 2007).

En estudios con el tumor ascítico de Ehrlich se observó cómo una rápida síntesis de GSH se asociaba con tasas elevadas de proliferación celular (Estrela, 1992). La depleción de GSH con BSO, un inhibidor de la γ -GCS (Meister, 1983) disminuía la tasa de proliferación de las células e inhibía el crecimiento del cáncer *in vivo* (Terradez, 1993). El mecanismo de inhibición es dependiente de la inhibición de la proteína quinasa C y de la acidificación del medio intracelular (Terradez y cols, 1994). El principal inconveniente de este tipo de terapia es que la **BSO carece de especificidad** por que disminuye el GSH tanto en tejidos tumorales como no tumorales (Terrader, 1993) (Lee y cols, 1987). La depleción de GSH sólo es terapéuticamente efectiva cuando se alcanzan niveles muy bajos

dentro de las células cancerosas (Estrela y cols., 2006). La administración intraperitoneal o intravenosa de ATP y dietilmaleato (DEM, compuesto α,β -carbonilo deplecionante de grupos tioles) permite alcanzar una depleción selectiva de GSH extrema en las células del tumor ascítico de Ehrlich *in vivo*, siendo la depleción en tejidos normales menor del 50% de los valores control (Estrela y cols, 1995). La hidrólisis de ATP extracelular (eATP) (vía ectofosforilasas de la membrana plasmática) libera adenosina, la cual entra en las células donde es utilizada para sintetizar ADP y ATP *de novo* (Lasso de la Vega y cols, 1994, Weissman y cols, 1988). La elevación de los niveles intracelulares de nucleótidos de adenina inhibe el complejo UMP sintetasa, lo que condiciona una inhibición de la síntesis de UTP y, consecuentemente, de ácidos nucleicos (Estrela y cols, 1995). A la inhibición del crecimiento celular inducida por eATP se asocia una disminución de la expresión de γ -GCS y, consecuentemente, de los niveles tumorales de GSH (Lasso de la Vega y cols, 1994). La irradiación (rayos X) de los ratones portadores, tratados previamente con ATP+DEM, permite eliminar a las células cancerosas sin dañar los tejidos normales y sin comprometer la vida del animal (Estrela y cols, 1995).

En el caso del desarrollo de una terapia específica con células con capacidad metastática existen diversas dificultades:

- Las células pueden alcanzar niveles de **GSH** extremadamente elevados en los órganos diana (Estrela y cols., 2006).
- Además, en tejidos donde la formación de metástasis es muy frecuente, tales como el hígado o el pulmón, la **hidrólisis de ATP** no induce una suficiente inhibición del crecimiento tumoral dado que, tanto hepatocitos como células alveolares pulmonares captan

adenosina libre con mayor facilidad que las células metastáticas (Estrela y cols, 1995).

- Agentes como el **DEM** o el forón han sido ampliamente estudiados en investigaciones toxicológicas, dando como resultado muchos **efectos secundarios** (Costa y Murphy, 1986; Naya y cols., 1990).
- El desarrollo de resistencias anticitotóxicas inducidas por la depleción de GSH en células como las CC531 de carcinoma de colon, está asociado a un aumento en la **expresión de la proteína Bcl-2** (Vahrmeijer y cols., 2000). Asimismo, diversos artículos han demostrado que niveles incrementados de Bcl-2 se asociaban con un aumento del contenido intracelular de GSH. En el caso de células B16M-F10, también se ha encontrado sobreexpresada dicha proteína con respecto a células B16M-F1 (con menor actividad metastática y contenido en GSH) (Ortega y cols., 2003a). Aún más, se observó *in vitro* que la citotoxicidad inducida por el HSE en estas células B16M-F10 era casi del 100% cuando las células metastáticas con GSH deplecionado eran tratadas con un oligonucleótido antisentido anti-*bcl-2* (Ortega y cols., 2003a).

Estos hechos sugieren que GSH y Bcl-2 pueden ser dianas moleculares importantes para regular la supervivencia de células tumorales con alto potencial metastático.

5.1. Depleción selectiva de GSH en células metastáticas.

PUNTOS CLAVE EN LA DEPLECIÓN SELECTIVA DE GSH:

Para abordar la depleción selectiva de GSH en las células tumorales nos centraremos en los **procesos de síntesis y transporte del mismo al espacio extracelular** y en la **depleción de GSH mitocondrial (mtGSH)**.

5.1.1. La síntesis.

Un agente que actúa disminuyendo la síntesis de GSH mediante la inhibición de la **enzima γ -GCS** es la molécula de BSO, pero ya se ha mencionado que dicha molécula no es específica de células tumorales.

Otra enzima implicada indirectamente en la síntesis de GSH es la **γ -GT** (apartado 4.2.) que actúa sobre el GSH extracelular facilitando la liberación del grupo γ -glutamil unido a un aminoácido y cisteinilglicina, sobre la que actuarán dipeptidasas unidas a la membrana liberando cisteína y glicina (Meister, 1983)). Ambos aminoácidos pueden actuar como precursores en la síntesis de *novo* del GSH (Meister, 1991). La sobreexpresión de γ -GT confiere a las células tumorales en crecimiento una gran ventaja a las concentraciones fisiológicas de cist(e)ina (Hanigan, 1995). Además el flujo entre órganos de GSH se ha propuesto como un sistema de distribución de cisteína, utilizado por tejidos con actividad γ -GT utilizada para la síntesis proteica y de GSH (Griffith y

Meister, 1979; Meister, 1991). De hecho, se ha visto como B16M-F10 induce el aumento de salida de GSH de los hepatocitos facilitando así moléculas adicionales del tripéptido a las células metastáticas (Obrador y cols., 2002).

La γ -GT contiene una subunidad pesada de 41,6 KDa que ancla la enzima a la membrana plasmática y una subunidad ligera de 19,7 KDa orientada hacia la cara exterior de la membrana celular que contiene el sitio catalítico (Horiuchi y cols., 1978).

Existen en la actualidad diversos inhibidores de la γ -GT en estudio. Entre ellos se encuentran el ácido 1-2-amino-4-boronobutanoico, cuya inhibición es reversible (Stein y cols., 2001), y los análogos del glutamato γ -fósforo monoéster y diéster. A diferencia del primero, los análogos diéster son muy reactivos y rápidamente fosforilan el residuo catalítico de la enzima consiguiendo eficientemente la inactivación de la γ -GT en humanos (Han y cols., 2006b; Li y cols., 2007). Los fosfonatos diésteres son buenos inhibidores irreversibles que causan inhibición tiempo-dependiente de las enzimas humanas, con ratios superiores en más de dos órdenes de magnitud a los de los monoésteres (Han y cols., 2007). También podemos encontrar otras moléculas ampliamente utilizadas en la inhibición de la γ -GT como son el complejo serina/borato (Tate y Meister, 1978) y la ACV. Esta última es un análogo anti-metabólico de la L-Gln y la inhibición que produce es irreversible (Stole y cols., 1994). Mediante la utilización de dicha molécula se ha visto cómo la hidrólisis del GSH por parte de la γ -GT afecta predominantemente a la subunidad ligera (Stole y cols., 1990).

Meister en 1995 encontró que la ACV inhibe la enzima de rata mediante una esterificación del residuo 523 (Thr), mientras que en cerdos y

humanos la esterificación sucede en la serina 405 y la serina 406, respectivamente. Los residuos Thr-523 y Ser-406 no son requeridos para la acción catalítica, pero su esterificación bloquea el sitio activo (Dimri y cols., 1995). La actividad de la ACV sobre la enzima parece depender de su capacidad para interactuar con los sitios de la enzima que normalmente unen los grupos α -carboxil y α -amino de γ -glutamilo.

5.1.2. Transporte al espacio extracelular.

Proteínas resistentes a multidroga:

En 1973 Dano demostró que células de tumor ascítico de Ehrlich “resistentes a multidroga” (**MDR**), eran capaces de disminuir las concentraciones intracelulares de daunorrubicina mediante un transporte activo (Dano y cols., 1985). En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glicoproteína en la membrana de las células MDR, la p-glicoproteína (**P-gp**) (Juliano y Ling, 1976), una bomba que transporta diferentes fármacos contra gradiente de concentración y mediante un mecanismo dependiente de ATP (Germann, 1996). El genoma humano codifica dos P-gps: una P-gp está codificada por el gen *MDR1*, localizado en la posición cromosómica 7q21 (Ambudkar y cols., 2003); y la otra está codificada por el gen *MDR2*. De las dos, sólo *MDR1*/Pgp funciona como un transportador de fármacos y está expresada en diferentes tejidos como el hígado, los riñones, colon, glándula adrenal y la barrera hemato-encefálica (Borst y cols., 2000; Hilgendorf y cols., 2007). Mientras que *MDR2*/Pgp se expresa principalmente en el hígado.

En 1992 Cole y cols. descubrieron un segundo tipo de bomba en células tumorales MDR, las MRPs (Cole y cols., 1992); la primera que se identificó fue la MRP1 en células resistentes a doxorrubicina, que no expresaban niveles elevados de P-gp. La sobreexpresión de MRP1 confiere resistencia a un amplio espectro de agentes, hecho similar, pero no idéntico, que sucede con P-gp.

Desde el descubrimiento de MRP1 [la más estudiada (Boumendjel y cols., 2005)], se han identificado ocho proteínas más: de MRP2 a 9 [las dos últimas identificadas como ABCC11 y ABCC12 (Lee y cols., 2000; Vidal-Vanaclocha y cols., 1993)].

A diferencia de P-gp cuyos sustratos son drogas hidrofóbicas, las MRPs pueden transportar moléculas hidrofílicas, aniones orgánico y fármacos neutros conjugados con GSH, glucuronato, sulfato o agentes anticancerígenos. Estos últimos no son metabolizados para dar conjugados de glutatión si no que se co-transportan con GSH libre (Boumendjel y cols., 2005).

Diferentes miembros de la familia de MRPs, que incluyen MRP1, 2, 4 y 5, median el transporte de GSH (Ballatori y cols., 2005). Recientemente, Hammond y cols (2007) han demostrado que las proteínas MRPs, y en especial MRP1, están implicadas en el flujo de salida de GSH en células que están sufriendo apoptosis.

Mucho antes del descubrimiento de la MRP1, estudios bioquímicos y genéticos demostraron la presencia de un transportador canalicular de aniones orgánicos en la membrana de los hepatocitos, que fue originalmente denominado transportador de aniones orgánicos multiespecífico canalicular o cMOAT (Borst y cols., 2000). Su función

fisiológica es la de facilitar la secreción hepatocitaria de glucuronato conjugado a bilirrubina hacia la bilis (Jedlitschky y cols., 1997). Hoy se identifica con la MRP2 (Williamson y cols., 2007).

Las MRPs no sólo median el transporte de GSH o de fármacos antitumorales al exterior celular. MRP4 y MRP5 también median resistencia a drogas antivirales basadas en nucleósidos (Schuetz y cols., 1999), . MRP4 se expresa en algunos tejidos humanos. Su mRNA se ha encontrado en niveles bajos en pulmón, riñón, amígdala, vejiga, hígado, próstata, ovario u cerebro (Lee y cols., 2000; Schuetz y cols., 2001). Aunque los niveles en el hígado son bajos en varias especies, recientemente se ha localizado MRP4/*Mrp4* en la membrana basolateral de hepatocitos humanos, de ratón y de rata, y en células HepG2, proporcionando una ruta alternativa en esas células para transportar GSH y sales biliares monoaniónicas (Rius y cols., 2003). La sobreexpresión de MRP4 en las células HepG2 se asocia a un aumento en la salida de GSH (Lai y Tan, 2002).

Regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR):

CFTR es un miembro de la familia ABC de proteínas (cassette de unión a ATP o ATP-binding cassette) a la que también pertenecen las proteínas MDR. Forma un canal de iones cloro y fosforilación dependiente de ATP (Gadsby y cols., 1995). Se han observado defectos en el transporte de cloruro por parte de CFTR en casos clínicos de fibrosis quística.

En 1998, Linsdell y Hanrahan vieron que CFTR, a parte de su papel como canal de Cl⁻ tenía una función regulando la permeabilización al GSH (Linsdell y Hanrahan, 1998). El transporte de GSH y GSSG vía CFTR

sugiere una similitud funcional entre CFTR y las proteínas ABC relacionadas estructuralmente con MRPs y el transportador de aniones orgánicos cMOAT o MRP2. Esta similitud es la que hizo que se clasificara a CFTR como un miembro de las MRPs, en concreto, el miembro ABCC7 (Aleksandrov y cols., 2007; Ballatori y cols., 2005).

CFTR puede mediar directamente el transporte de GSH; como se ha demostrado en experimentos con vesículas de membrana y proteoliposomas (Kogan y cols., 2003). Además, la presencia de GSH inhibe la actividad ATPasa de CFTR lo cual podría cambiar las propiedades de CFTR favoreciendo la salida de GSH sobre la salida de cloruro (Kogan y cols., 2003).

5.1.3. Depleción de mtGSH.

El mantenimiento del estatus redox tiólico, regulado preferentemente por el GSH, es crítico para muchas de las funciones mitocondriales incluyendo el mantenimiento de la integridad de las membranas, la homeostasis iónica, y la actividad de enzimas dependientes de sulfhidrilos. Numerosos estudios han demostrado la importancia toxicológica de una depleción de mtGSH, particularmente en varias formas de enfermedades debidas a agentes químicos o patológicas (Carretero y cols., 2000; Ghosh y cols., 2005; Lash y Anders, 1987).

Muchos tumores y células de división rápida muestran una especial preferencia por la L-Gln, el aminoácido más abundante en plasma, como substrato energético (Kovacevic, 1971). Una respuesta del hospedador al crecimiento de un tumor es la depleción de dicho aminoácido en el

músculo esquelético (Chen y cols., 1993). Este aminoácido es oxidado a mayor velocidad que la glucosa y que otros aminoácidos por el tumor ascítico de Ehrlich (Lazo, 1981). La preferencia por la L-Gln se ha correlacionado con una mayor actividad glutaminasa en diferentes tumores (Bode y Souba, 1994; Linder-Horowitz y cols., 1969). También se ha visto en células de fibrosarcoma L929, *in vitro*, que la utilización de L-Gln aumenta la susceptibilidad de las células tumorales al tratamiento con TNF- α .; sugiriendo que la oxidación de la L-Gln genera unas condiciones metabólicas que facilitan la producción de ROS bajo la estimulación de TNF- α (Goossens y cols., 1996). Paralelamente se ha observado que el TNF- α induce una oxidación del mtGSH (Obrador y cols., 1997), un hecho que es consistente con la idea de que el mtGSH juega un papel clave en la neutralización de ROS (Goossens y cols., 1995).

El glutamato (L-Glu), producto directo del metabolismo de la glutamina a través de la glutaminasa, es un inhibidor potencial del transporte de GSH al interior de la mitocondria (Coll y cols., 2003; Chen y cols., 2000). Una dieta enriquecida en L-Gln, aumenta los niveles citosólicos de L-Glu en células tumorales (Ehrlich) *in vivo*, lo cual induce una inhibición en el transporte mitocondrial de GSH (Carretero y cols., 2000). Las mitocondrias tienen un papel central en el mecanismo de muerte y se consideran un objetivo potencial para la terapia del cáncer (Costantini y cols., 2000). La alteración transitoria en la permeabilidad de las membranas mitocondriales se asocia a la apertura del complejo del poro de permeabilidad transitoria (PTPC), lo cual posibilita la salida al citosol de señales moleculares proapoptóticas (por ejemplo, citocromo c, factor inductor de la apoptosis) (Costantini y cols., 2000). Dicha apertura está regulada por muchos factores endógenos: por ejemplo, cationes divalentes,

protones, ATP, GSH, ROS, NO, ceramida, proteínas pro- y anti-apoptóticas, etc. El mtGSH, transportado desde el citosol vía un transportador específico de alta afinidad (Martensson y cols., 1990), regula la apertura de los PTPC (Carretero y cols., 2000; Costantini y cols., 2000; Hall, 1999). El aumento en la generación de ROS a nivel mitocondrial (por ejemplo, por estímulo de TNF- α), bajo condiciones de depleción selectiva de mtGSH en células tumorales (como la inducida *in vivo* por una dieta enriquecida en L-Gln), causa una oxidación del mtGSH suficiente como para activar la cascada apoptótica (Obrador y cols., 2001).

Se ha visto que los niveles de Bcl-2 influyen sobre el límite crítico de niveles de mtGSH que se deben alcanzar para activar la salida de moléculas proapoptóticas (por debajo del 30% de los valores controles de mtGSH en células de B16M-F10 que mantienen niveles control de Bcl-2) (Obrador y cols., 2001); sin embargo cuando se trata de células de B16M-F10 pre-tratadas con un oligonucleótido antisentido anti-*bcl-2*, una disminución del mtGSH de un 40%, con respecto a los valores control, activa los mecanismos de muerte celular (Ortega y cols., 2003a).

5.2. Regulación de los niveles de Bcl-2 en células tumorales.

En estudios realizados con células de linfoma, tratadas con agentes inductores de apoptosis, sobre la relación entre la expresión de Bcl-2 y producción de H₂O₂, evidenciaron que Bcl-2 favorecía un aumento del NAD (P) H mitocondrial, y la producción constitutiva de H₂O₂. Además se observó que Bcl-2 hacía a las células resistentes a entrar en apoptosis tras la estimulación con ceramida (Esposti y cols., 1999). Los resultados obtenidos por Esposti y colaboradores, en lo referente al aumento de H₂O₂, concuerdan con los publicados por Steinman, quien indicó que, además de las propiedades antioxidantes, la Bcl-2 también puede actuar como un prooxidante (Steinman, 1995). Esto sugiere que la expresión de Bcl-2 facilita la adaptación celular a elevados niveles de estrés oxidativo, (Voehringer y Meyn, 2000). En 1993, Kane y colaboradores observaron como las células que sobreexpresaban Bcl-2 mostraban mayores niveles de GSH (Kane y cols., 1993; Lee y cols., 2001; Papadopoulos y cols., 1998).

La Bcl-2 participa en el mantenimiento del estado rédox celular a diferentes niveles. Se ha observado como la sobreexpresión de la Bcl-2, además de aumentar los niveles de GSH, aumenta la expresión de enzimas antioxidantes (Jang y Surh, 2003; Lee y cols., 2001; Merad-Saidoune y cols., 1999; Papadopoulos y cols., 1998). Sin embargo, existen evidencias para pensar que los efectos de la Bcl-2 en la expresión de enzimas antioxidantes es específica de cada tipo celular (Jang y Surh, 2003). Por ejemplo, Bcl-2 aumenta la actividad CAT en células PC12 pero no en GT1-7, mientras que las actividades GPx y GR son en ambos tipos celulares muy similares (Ellerby y cols., 1996). La sobreexpresión de Bcl-2

en astrocitos se corresponde con un aumento en las actividades SOD y GPx, sin embargo las células FL5-12 no muestran ningún cambio en ninguna de las actividades enzimáticas antioxidantes (Papadopoulos y cols., 1998).

En biopsias de melanoma maligno metastático humano, se observó, que tras el tratamiento, existían zonas de crecimiento tumoral que no habían sido afectadas por el mismo. En estas regiones se producía una sobreexpresión, respecto a los pacientes que no se habían sometido a tratamiento, de Bcl-2. En este estudio se indica que, tras el tratamiento, sobreviven clones celulares de melanoma con elevados niveles de Bcl-2 que previenen la apoptosis, y teóricamente facilitarían la progresión de la enfermedad una vez finalizada la terapia. Así pues, Bcl-2, y otras proteínas pertenecientes a su familia, están consideradas como potenciales dianas en la terapia del cáncer (Hakansson y cols., 2003).

En el caso de las células de melanoma B16, el análisis de la expresión de genes de la familia de *bcl-2* reveló que las células de la línea B16-F10 (con alto poder metastático) comparadas con las F1 (de bajo poder metastático), sobreexpresaban preferentemente Bcl-2 (~ 5.7 veces más) (Ortega y cols., 2003a).

Al estudiar los niveles de GSH en células que sobreexpresan la Bcl-2, se observó un aumento en los mismos, sin aumento paralelo en la tasa de síntesis. Este aumento es causado por una disminución en la salida de GSH de la célula, el cual es reducido considerablemente en las condiciones en las que existe sobreexpresión de la Bcl-2 (Ortega y cols., 2003a). En este mismo estudio se realizaron experimentos *in vitro* sobre la influencia de la Bcl-2 y del GSH en la citotoxicidad tumoral inducida por las células del

HSE, y se observó que la depleción de GSH y Bcl-2 mediante terapia antisentido disminuía la viabilidad de las células B16M-F10 hasta en un 97% (Ortega y cols., 2003a).

La terapia antisentido contra la proteína Bcl-2 se encuentra en fase III de experimentación para melanoma, mieloma, leucemia mieloide u leucemia linfática crónica (Bedikian y cols., 2006; O'Brien y cols., 2007). Pero no sólo se han desarrollado oligonucleótidos que actúan sobre el mRNA de *bcl-2*, sino también oligonucleótidos antisentido contra diferentes mRNA que son traducidos en proteínas que actúan, por ejemplo, en la proliferación celular o en la angiogénesis (Dai y cols., 2007b; Lin y cols., 2007; Tanabe y cols., 2003).

De todas formas, aunque *a priori* parece que en cierto modo se está realizando una terapia selectiva anticancerígena menos tóxica que la terapia convencional, la terapia antisentido sobre proteínas asociadas a procesos tumorales podría producir efectos secundarios difíciles de predecir. Además puede resultar insuficiente para lograr un tratamiento efectivo. Por esta razón la terapia antisentido debe ser aplicada combinada con los otros tratamientos (Biroccio y cols., 2003; Dai y cols., 2007a; Dias y Stein, 2002).

OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos en la introducción, se planteó como objetivo general, el investigar si la depleción selectiva de GSH en células metastáticas B16M-F10 podría ser una herramienta en la terapia antitumoral.

A tal efecto decidimos estudiar los siguientes objetivos concretos:

- Los mecanismos de transporte de GSH en la membrana plasmática de células metastáticas de melanoma.
- Impulsar su regulación que podría favorecer la disminución de GSH.
- Potenciar la depleción del GSH mitocondrial y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes como una herramienta para sensibilizar las células B16M-F10 a la citotoxicidad generada por citokinas:
 - Disminución del transporte de GSH a la mitocondria mediante L-Gln.
 - Potenciar la susceptibilidad al estrés oxidativo/nitrosativo mediante un oligonucleótido antisentido de *bcl-2*.
 - Disminución de la actividad de enzimas antioxidantes implicadas en la defensa mitocondrial frente al estrés oxidativo/nitrosativo.

*MATERIA Y
MÉTODOS*

1. Cultivo de las células de melanoma B16 (B16M).

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

Las células B16M-F10 (procedentes de la ATCC, Rockville, MD) y las células B16M-Gln⁺, iB16M, iB16M-Gln⁺ y hr-iB16M-Gln⁺ se sembraron y cultivaron con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen), pH7.4, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Invitrogen), 10mM de HEPES, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las células sembradas se mantuvieron en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

La viabilidad celular se midió por el ensayo de exclusión de azul tripán y el ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa.

2. Animales de experimentación.

Los ensayos *in vivo* se realizaron con ratones C57BL/6J de ambos sexos (Charles River). 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 siguiendo la normativa internacional vigente descrita por National Institutes Health (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publ. No. 85-23, 1985, USA). Los animales se aclimataron a su nuevo ambiente durante 15 días antes de comenzar los experimentos.

3. Dieta enriquecida con Gln (GED).

Durante los diferentes experimentos, se utilizaron varios tipos de dieta para alimentar a los animales:

La *dieta estándar* (SD) procedente de la casa Panlab (dieta n°210) que se componía de 23% de caseína, 58% de glucosa y almidón, 5% de grasa vegetal y animal, 6% de celulosa, 7% de compuestos minerales y un 1% de complejos vitamínicos.

La *dieta enriquecida en Gln* (GED) (sólo en los experimentos donde se especifica su utilización) que correspondía con la dieta estándar 210 (Panlab) pero con la siguiente modificación: el 20% de la proteína total corresponde a L-Gln.

4. Sistema de perfusión de células B16M-F10.

El tampón de perfusión gaseado con 95% de aire, 5% de CO₂ fue bombeado mediante una bomba multiperpex LKB (tipo 2115) a una cámara que contenía un volumen final de 10 ml con 3×10^6 células/ml (ver figura 1). La suspensión tumoral se perfusionó a 37°C y se mantuvo en un estado de suspensión homogénea con un agitador magnético.

El tampón de perfusión estaba constituido por un medio Krebs-Henseleit bicarbonato [composición (en mM/litro): NaCl, 119; KCl, 4,7;

MgSO₄ , 1,5; KH₂PO₄ , 1,2; NaHCO₃ , 25; CaCl₂ , 2,5; MgSO₄ , 1,2 y glucosa, 11], conteniendo concentraciones plasmáticas de aminoácidos libres encontrados en los ratones C57BL/6J portadores de tumor, glucosa, piruvato sódico, suero fetal libre de albúmina, penicilina y estreptomicina.

La toma de muestras (0,5ml) de la suspensión celular se realizó con una jeringa a través de un septum sin interrumpir el flujo.

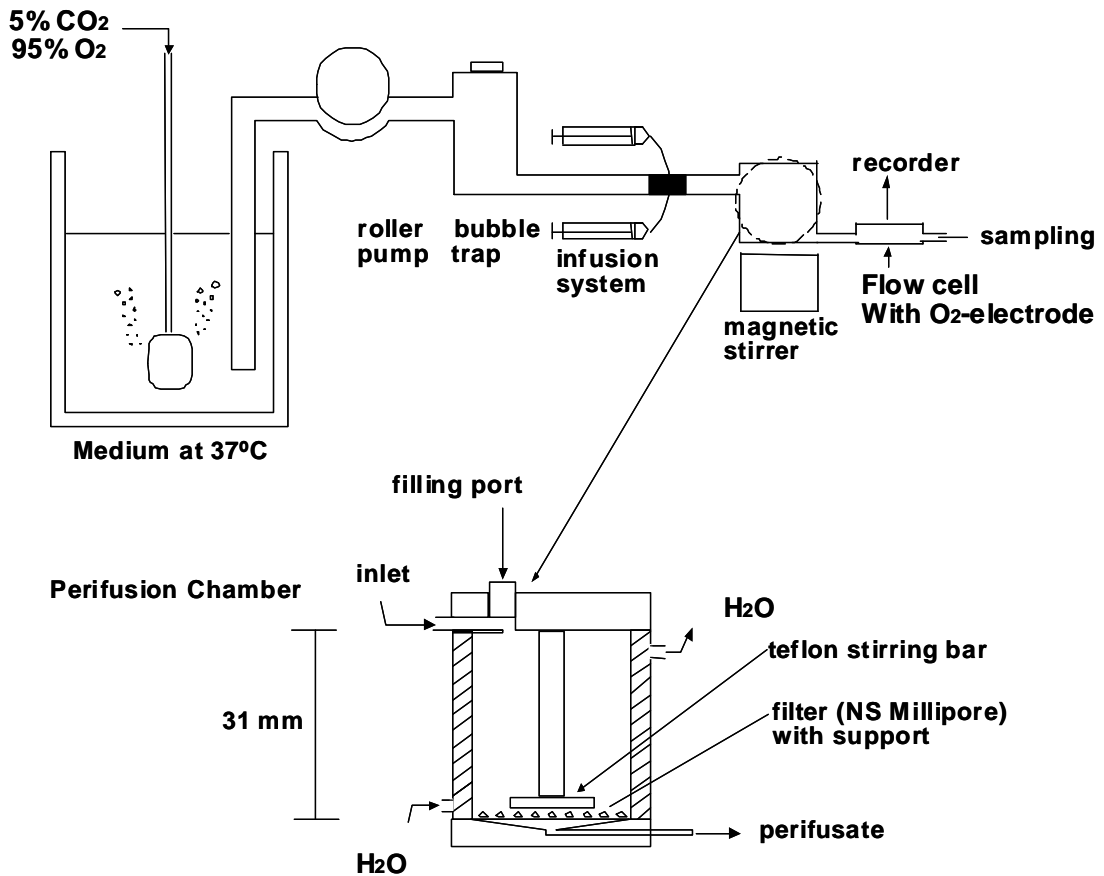


Figura 1. Esquema del sistema de perfusión.

5. Metabolitos.

5.1. Determinación del GSH y GSSG.

El método utilizado para la determinación del GSH está basado en la medida espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (SIGMA) mediante la reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (SIGMA) (Akerboom y Sies, 1981). El producto obtenido, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión presenta un máximo de absorción a 340nm. En la determinación de las muestras se añadió a la mezcla de reacción 0.8ml de fosfato potásico 0.1M, EDTA 1mM (pH7.0), 0.1ml muestra en ácido perclórico (PCA) (PANREAC) al 2%, 10µl CDNB. La formación del producto se observa por la variación de absorbancia a 340nm que se produce al añadir 0.01ml de glutatión S-transferasa 500U/ml en tampón fosfato sódico 0.1M, EDTA 1mM (pH 7.4).

Para la determinación de GSSG por HPLC (Asensi y cols., 1994), las muestras fueron derivatizadas. Para ello primero se basificaron las muestras extraídas en PCA al 30% con KOH 3M CHES 0,3 M hasta un pH de entre 9 a 9,5. Tras centrifugar las muestras (15 minutos a 15000 g y 4 ° C) se cogieron unas alícuotas de sobrenadante (25µl), se añadieron 50 µl de fluorodinitrobenceno (FDNB), al 1% y se mantuvieron en oscuridad 45 minutos. Tras desecar al vacío las muestras fueron resuspendidas en 200 µl de fase A (80% metanol y 20% agua) y se analizaron con el HPLC (Shimadzu). Se utilizó un patrón formado de distintas concentraciones de GSSG que sufrió el mismo procedimiento que las muestras para ser derivatizado y pinchado.

Para la determinación del GSH total se siguió el método de Tietze que está basado en la medición espectrofotométrica de la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma) por intervención de GSH o GSSG y la GR con NADPH (ROCHE) (Akerboom y Sies, 1981). Para ello se preparó un *cocktail* compuesto de 1 ml de tampón fosfato potásico (Kpi, 0,1M y pH 7) + 20 µl de DTNB (1,5 mg/ml) + 50 µl de NADPH (4mg/ml) + 100 µl de la muestra diluída 10 veces en Kpi. Se incubó a 30°C y se registró el blanco a 412 nm. Tras añadir 10 µl de GR se mide la variación de absorción.

5.2. Consumo de cistina.

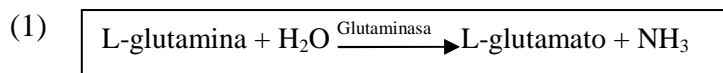
Se sembraron células B16M-F10 en frascos de 25 cm². A los tiempos requeridos, las células se lavaron tres veces con medio de transporte (10 mM PBS, pH 7.4, con 0.01% CaCl₂, 0.01% MgCl₂ y 0.1% glucosa). La medida del consumo se inició mediante la adición de 1ml de medio de transporte conteniendo 1 µCi de L-[³H] cistina (Amersham Biosciences) y cistina no radioactiva (0,5mM). Después de incubar a 37°C, se finalizó el consumo mediante lavados con tampón fosfato salino (PBS) frío hasta el momento en el que se detectó menos del 0,001% de la radioactividad inicial en el sobrenadante. Las células se lisaron con 0,5ml de NaOH 0,5N y se tomó una alícuota para determinar la radioactividad con un contador de centelleo (LKB Wallace 8100 LSC).

5.3. Análisis de aminoácidos.

Las muestras sanguíneas se recogieron en jeringas de 1ml que contenían heparina sódica (0,05ml de una solución al 5% en NaCl al 0,9%). Tanto el plasma como la fracción intracelular de las células tumorales (ver apartado 22 de “material y métodos”), se trataron con ácido sulfosalicílico al 0,5% en tampón citrato 0.3M y pH 2.8 para la precipitación proteica final (Estrela y cols., 1992). Después de centrifugar (10 minutos a 3500 r.p.m.), 50 µl de sobrenadante se inyectaron en un analizador de aminoácidos LKB 4151 alpha plus (LKB Biochrom).

5.4. Transporte de L-Gln del músculo esquelético.

Tras la extracción del músculo, 0,5mg fueron homogenados con Na₃PO₄ (50 mM). Se tomó una alícuota de esta solución para la determinación proteica y el resto se desproteinizó con 10% de ácido tricloroacético. La solución se centrifugó durante 15 minutos y el sobrenadante se neutralizó con K₃PO₄ 0,48M. De aquí se determinó la concentración de Gln mediante el método de Lund: el ensayo utiliza la enzima glutaminasa que hidroliza la glutamina para dar Glu y NH₃. El Glu formado se determina por el método de la Glu deshidrogenasa (Bernt y Bergmeyer, Methods of enzymatic análisis, vol.4, pg1704). La dos reacciones que tienen lugar son:



La mezcla para el ensayo consta de: 500µl de tampón acetato (0,5M, pH 5), 20µl glutaminasa (10U/ml de tampón acetato), 100µl de muestra y 400µl de H₂O. Se incubó la mezcla durante 60 minutos a 37°C, tiempo tras el cual se llevaron los tubos a 4°C para detener la reacción.

También se prepararon reacciones sin glutaminasa para cada muestra con las que se determinó la concentración de Glu existente que se restó a su correspondiente ensayo con glutaminasa.

La determinación de Glu se realizó con 500µl de la mezcla de reacción anterior y la siguiente mezcla de reactivos: 1ml de tampón glicina-hidrazina (pH 9), 50µl de ADP (33,5mM, en H₂O), 100µl de NAD (27mM). La lectura del blanco se realiza antes de añadir la enzima Glu deshidrogenasa a 340nm (longitud de onda a la que absorbe NADPH). Después se añaden 30µl de la enzima a una concentración de 4,5U/ml y se deja incubar durante 60 minutos a T^a ambiente antes de la lectura.

5.5. Transporte de GSH mitocondrial.

Para evaluar el transporte de GSH a la mitocondria, se utilizaron mitocondrias recién aisladas (ver apartado 22 de “material y métodos”) que se resuspendieron durante 10 minutos en medio de incubación, el cual estaba compuesto por KCl 160mM, MgCl₂ 0.2mM, EGTA 1mM, MOPS 50mM, KH₂PO₄ 1mM y succinato 5mM. Las mitocondrias se utilizaron inmediatamente tras su preparación para eliminar la pérdida del contenido inicial de GSH. Utilizando una variación de la técnica descrita por Martensson y cols. (1990) se midió la velocidad de captación de GSH hacia la matriz mitocondrial a 25°C (volumen de 500µl) en mezclas que

contenían el medio de incubación y 1-3mM (1 μ Ci por ensayo) 35 S-GSH. La captación se inició por adición de 20 μ l de la suspensión mitocondrial (concentración final de 1 mg proteína/ml). La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford. Las incubaciones finalizaron por centrifugación de las mitocondrias en Ficoll a 10000g durante 3 min a 4°C. El pellet de mitocondrias se lavó 2 veces a 4°C con un medio que contenía sacarosa 0.3M, EGTA 1mM, MOPS 5mM, KH₂PO₄ 5mM y 0.1% de albúmina de suero bovino, pH 7.4 ajustado con KOH. De esta forma se eliminó el GSH del espacio intermembrana. Posteriormente se resuspendió el pellet en 50 μ l de ácido sulfosalicílico y se centrifugó a 2000g durante 3 min. El 35 S se midió en el sobrenadante.

5.6. Determinación de ATP

Para la determinación de ATP se realizó con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Lamprecht y Trautschold, 1974). Las soluciones que se prepararon fueron: tris HCl 50mM (pH 7.5), NADP 0.1M, MgCl₂ 10mM, glucosa 0.5M, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1mg proteína/ml, hexoquinasa 2mg proteína/ml. La adición de la muestra y medida del blanco de la reacción se realizó antes de añadir la hexoquinasa. Una vez añadida la hexoquinasa el progreso de la reacción se siguió por espectrofotometría a 340nm, longitud de onda a la que absorbe el NADPH.

5.7. Generación de H₂O₂ .

El ensayo de producción de H₂O₂ se basa en la oxidación del ácido homovalínico (ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético) dependiente del

H₂O₂, a un dímero fluorescente (ácido 2,2'-dihidroxidifenil-5,5'-diacético), que está catalizado por la peroxidasa de rábano picante (Ruch y cols. 1983). Las células previamente lisadas por sonicación, se incubaron en presencia de ácido homovalínico 100μM y 1U peroxidasa de rábano picante/ml en medio Krebs-Henseleit con Ca²⁺. La reacción se detuvo añadiendo tampón glicina 0.2M, EDTA 50mM y NaOH 2,2M (pH 12). Se encontró una relación lineal entre la fluorescencia (λexcitación=312nm y λemisión=420nm) y la cantidad de H₂O₂ en el rango de 0.1-12nmol por cada 2ml de ensayo.

6. Determinación cuantitativa del potencial de membrana mitocondrial.

Las medidas del potencial de membrana mitocondrial se llevaron a cabo basándonos en la captura del catión lipofílico radiomarcado metil-trifenilfosfato (TPMP), lo cual permite determinar pequeños cambios en el potencial (Scarlett y cols 2000). Se incubaron las células (2x10⁶) durante 1 hora a 37°C con medio de cultivo y TPMP 1μM, 250nCi [³H]TPMP y tetrafenilborato sódico. Tras la incubación las células se recogieron por centrifugación (1000gx5min). Se recogieron 100 μl de sobrenadante. El pellet se resuspendió en 100μl de Triton X-100 al 10%. La radioactividad se midió tanto en el sobrenadante como en el pellet utilizando un contador de centelleo (LKB Wallace 8100 LSC). La captación de TPMP energético dependiente se expresó en proporción de acumulación en el interior de la matriz:

$$\left[\frac{\text{TPMP/mg proteína}}{\text{TPMP/}\mu\text{l sobrenadante}} \right]$$

7. Actividades enzimáticas

7.1. Actividades enzimáticas relacionadas con el GSH.

Las células fueron resuspendidas, y homogenadas con tampón fosfato 0.1 M a pH 7.2 y a 4 °C, en el mismo tampón en todos los casos.

- La actividad **γ -GCS** se determinó por monitorización de la velocidad de desaparición de NADH a 37°C en una mezcla de reacción (1ml de volumen final) que contenía tampón Tris HCl 200mM (pH 8.2), KCl 100mM, ATP 5mM, fosfoenolpiruvato 2mM, L-glutamato 10mM, L- α -aminobutirato 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM, NADH 0.5mM, 20 μ g de piruvato quinasa y 20 μ g de lactato deshidrogenasa. Se midió la absorbancia a 340nm. Una unidad de enzima cataliza la formación de 1nmol de producto/hora a 37°C.
- La actividad **GSH sintetasa** se midió por la formación de ADP. La mezcla de reacción (volumen final 0.2ml) contenía tampón Tris HCl 200mM (pH 8.2), KCl 100mM, ATP 5mM, L- γ -glutamil-L- α -aminobutirato 5mM, glicina 5mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM y la muestra. La mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos a 37°C. Para determinar la cantidad de ADP se añadieron 50 μ l de ácido sulfosalicílico al 10% y 1.8 ml de una disolución que contenía fosfoenolpiruvato 2mM, NADH 0.5mM, MgCl₂ 10mM, KCl 100mM, tampón fosfato 0.2M (pH 7.0) y 20 μ g de piruvato quinasa. La cantidad de ADP formada se calculó por la variación observada en la absorbancia a 340nm tras la adición de 20 μ g de lactato

deshidrogenasa. Una unidad de enzima cataliza la síntesis de 1 μ mol de L- γ -glutamil-L- α -aminobutirilglicina en 1 hora a 37°C.

- Para la actividad **GR**, se midió espectrofotométricamente la oxidación del NADPH a 340nm que es catalizado por la enzima en presencia de GSSG a NADP⁺ y 2GSH. En la mezcla de reacción se encontraba tampón fosfato de potasio a 0,2M y pH 7.0, EDTA 2 mM, NADPH 2 mM disuelto previamente en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7.0, GSSG 20 mM y 50 μ l de muestra enzimática. Una unidad de actividad GR se define como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reducción de un μ mol de NADPH por minuto. La actividad se expresa en mU o U/mg proteína.
- La actividad **γ -GT** se midió espectrofotométricamente. La enzima cataliza la siguiente reacción en la que el aceptor del grupo γ -glutamilo de γ -glutamil -p- nitroanilida es la glicilglicina :

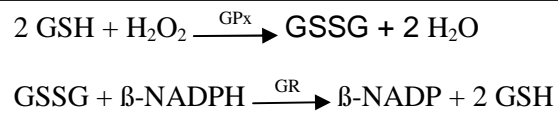


La formación de p-nitroanilina (PNA) se determinó espectrofotométricamente a 405 nm.

A los 30 minutos de iniciar la reacción se paró ésta con ácido acético 4 N y se centrifugaron los tubos a 3500 r.p.m. durante 10 minutos. Tras este tiempo se leyó la absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que produce un μ mol de p-nitroanilida/min.

- La actividad **GPx** se midió indirectamente utilizando como substrato H₂O₂, que junto con GSH, es reducido a H₂O formandose GSSG. Esta molécula será utilizada por GR en una segunda

reacción donde será reducido por dicha enzima utilizando NADPH. La oxidación de NADPH se midió a 340nm.

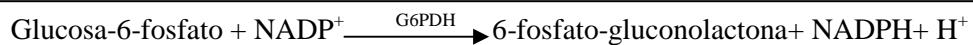


En la mezcla de reacción se encontraba 450 μl de tampón fosfato de potasio (0,1M y pH 7.4), 50 μl de azida sódica (1 mM), 100 μl de NADPH (1,5 mM, disuelto previamente en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7.0), 100 μl de GSH (10 mM), 100 μl de GR (2,4U/ml) y 50 μl de muestra enzimática. Una mU = 1nmol NADPH/min.

7.2. Otras actividades enzimáticas.

7.2.1. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Para medir la actividad de esta enzima, se utilizó el siguiente principio:



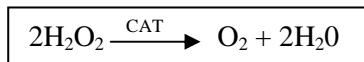
De tal forma que se puede determinar en el tiempo el aumento de absorbancia(A) a 340nm. Una unidad enzimática = 1 μmol NADPH/min.

Para ello se utilizó como mezcla de reacción: 0,1ml de tampón Tris-HCl (0,5M y pH 7,5), 100 μl de NADP (3,8 mM), 100 μl de MgCl_2 (0,63 M), 100 μl de glucosa-6-fosfato (33 mM) y 0,5mg de maleimida para inhibir a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa endógena. Se adicionó H_2O

(0,58ml) y 20µl de muestra para obtener 1ml de reacción. Se midió el aumento de A durante 3 minutos.

7.2.2. CAT.

Basándose en el método establecido por Aebi (Aebi, 1984); se midió en el tiempo la descomposición del peróxido de hidrógeno según la reacción:



Para ello se mezcló en la cubeta tampón fosfato 50mM, pH 7, H₂O₂ (10,34mM) y 100µl de la muestra. El descenso de A se midió a 240nm a intervalos de 15 segundos durante un minuto.

7.2.3. Superóxido dismutasa (SOD).

La SOD cataliza la transformación de dos moléculas de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.:



Para calcular la actividad de esta enzima, se siguió el método descrito por Flohé y Otting (Flohe y Otting, 1984) mediante la utilización de citocromo C.

La reducción del citocromo C por parte del superóxido se puede seguir espectrofotométricamente a 550nm utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa como fuente de superóxido. La actividad de SOD se midió por el grado de inhibición en la velocidad de reducción del citocromo C.

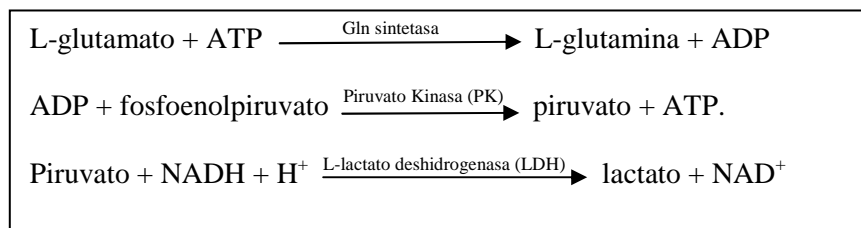
El ensayo se realiza mezclando tampón fosfato 0,1M, EDTA 0,2mM a pH7.8 con xantina (0,25mM), citocromo C³⁺ (0,2mM) y xantina oxidasa (0,25U/ml). A este *cocktail* se le añade la muestra y se mide la pendiente a 25° durante dos minutos.

Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la velocidad de reducción del citocromo C³⁺.

Para diferenciar la actividad Mn-SOD de la actividad debida a Cu,Zn-SOD, se realizaron los ensayos añadiendo 2mM de cianuro al *cocktail* que inhibe la actividad de Cu,Zn-SOD (Halliwell, Eur.J.biochem.55,355 (1975)).

7.2.4. Glutamina sintetasa.

Se analizó la actividad de ésta por método colorimétrico siguiendo el siguiente principio:



Se mide a 340nm la disminución de NADH en la muestra; para ello se utilizan concentraciones de PK y LDH elevadas para que el proceso dependa de la actividad de Gln sintetasa.

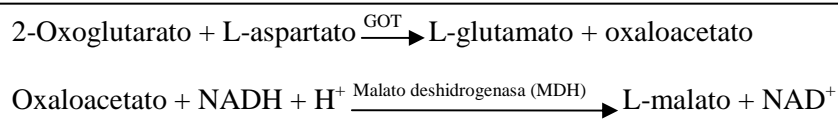
Para el ensayo se siguió el protocolo establecido por Sigma. Para ello se utilizaron 2,86ml de un *cocktail* de reacción compuesto por: tampón imidazol HCl a pH7.1 y 37°C, glutamato sódico (3M), ATP (250mM), fosfoenopiruvato (33mM), MgCl₂ (900mM), KCl (1M), NH₄Cl (1,2M),

NADH (12,8mM); después se adicionaron 40µl de solución enzimática PK/LDH (Sigma) y la muestra (100µl). Se mide la disminución de A_{340} durante 10 minutos.

Se define como una unidad de actividad enzimática a la que transforma un µmol de L-Glu en L-Gln en 15 minutos a pH7.1 y 37°C.

7.2.5. Aspartato aminotransferasa (AST) o glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT).

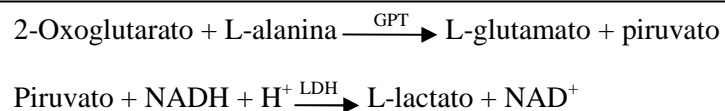
Para calcular esta actividad se utilizó el principio descrito por Bermeyer (Bergmeyer y cols., 1974):



De esta forma, al igual que en casos anteriores, se mide la disminución de A_{340} . En el ensayo se utilizaron: 3ml de tampón fosfato (0,1M y pH 7.4 con 5mg/ml de L-aspartato), 100µl de 2-oxoglutarato (30mg/ml; pH 7), 50µl NADH (a 10mg/ml en solución salina), 10µl MDH (2mg/ml) y 20µl de muestra en tampón fosfato a 0,1M y pH 7,4. La medida se realiza cada 60 segundos durante 5 minutos. Una unidad de actividad es la cantidad necesaria para transformar 1 µmol de oxoglutarato en un minuto.

7.2.6. Alanina aminotransferasa (ALT) o glutamato-piruvato transaminasa (GPT).

Se desarrolló un ensayo colorimétrico basándose en las siguientes reacciones:

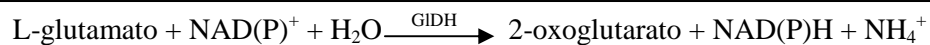


Aquí se vuelve a medir mediante el espectrofotómetro la disminución de NADH a 340nm en el tiempo (cada 60 segundos durante 5 minutos).

En el ensayo se utilizaron 3ml de tampón fosfato (50mM y pH 7.5 que contenía 97mg/ml de L-alanina), 150µl de 2-oxoglutarato (30mg/ml a pH 7), 50µl NADH (a 10mg/ml en solución salina), 10µl LDH (5mg/ml) y 20µl de muestra en tampón fosfato a 0,05M y pH 7,5). Una unidad de actividad es la cantidad necesaria para producir 1mmol de NAD⁺ por minuto.

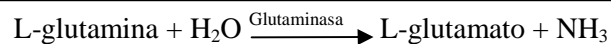
7.3.7. *Glutamato deshidrogenasa (GIDH).*

Siguiendo el método descrito por Bergmeyer (Bergmeyer y cols., 1974) se puede calcular la actividad de GIDH por la formación de NAD(P)H en la siguiente reacción:



Se utilizó la siguiente mezcla: 2,5ml de tampón imidazol (0,1M y pH 7,3), 200µl de 2-oxoglutarato (0,2M), 500µl de acetato amónico (12,8M), 30µl de NADH (a 10mg/ml en solución salina), 100µl EDTA (a 10mg/ml en solución salina), 30µl ADP (0,1M) y 20µl de muestra. Las mediciones se realizarán a 340nm.

7.3.8. *Glutaminasa.*



El glutamato que se forma en esta reacción puede ser determinado mediante la utilización de GDH, donde lo que podremos ver es un aumento de A_{340} debida a la formación de NAD(P)H.

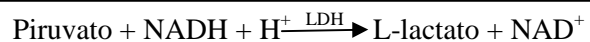
Para que se dé la primera reacción, se incubó la siguiente mezcla durante 30 minutos a 37°C: 250µl de tampón acetato (0,1M y pH 4,9 que contiene 80mM de L-Gln) y 250µl de la muestra en agua destilada.

Transcurridos estos 30 minutos se paró la reacción introduciendo en la muestra PCA frío al 10%. La muestra se centrifugó a 16000g durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante que es donde se encontraba el glutamato formado. La determinación del glutamato se llevó a cabo mediante el método de Bernt y Bergmeyer (ver apartado 5.4. de “material y métodos”).

7.3.9. *Lactato deshidrogenasa (LDH).*

Se midió esta enzima en el caso de fraccionamiento celular, para ver si las membranas citoplasmáticas se rompían y salía el contenido citosólico al medio donde estaban las células resuspendidas.

Se realizó un ensayo colorimétrico donde se podía estudiar la variación de A_{340} debida al consumo de NADH:



Para ello se utilizó la siguiente mezcla: 3ml de tampón fosfato 0,05M y pH 7,5 que contiene piruvato (0,63mM), 50µl de NADH

(11,3mM) y 100µl de muestra. Al mezclar se realiza una medición a 340nm y se repite cada minuto durante tres minutos.

8. Transferencia del gen *bcl-2* y análisis de Bcl-2.

Para insertar el gen murino de *bcl-2* y transfectar las células B16, se utilizó el sistema de expresión Tet-off de Clontech. En los sistemas Tet, el primer componente crítico es la proteína reguladora, basado en la proteína represora de Tet (TetR) de E.coli.

En los sistemas Tet-off (figura 2), esta proteína está 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 que expresa en nuestro caso a Bcl-2 murina bajo el control del elemento de respuesta a tetraciclina o TRE. El plásmido que lleva el elemento de respuesta es pTRE el cual incluye también un gen de resistencia a la higromicina. Tanto pTRE como p-Tet-off deben integrarse en las células huésped para crear una línea celular estable.

Para introducir nuestro fragmento, dentro del vector de respuesta (pTRE), se necesitó introducir fragmentos compatibles con los sitios de restricción del vector que fueron generados por PCR incorporando los sitios de restricción dentro de los *primers*. Digerimos el vector de respuesta

Material y métodos

con las enzimas de restricción, lo tratamos con fosfatasa y se purificó. Después se ligaron el vector respuesta y el gen *bcl-2*.

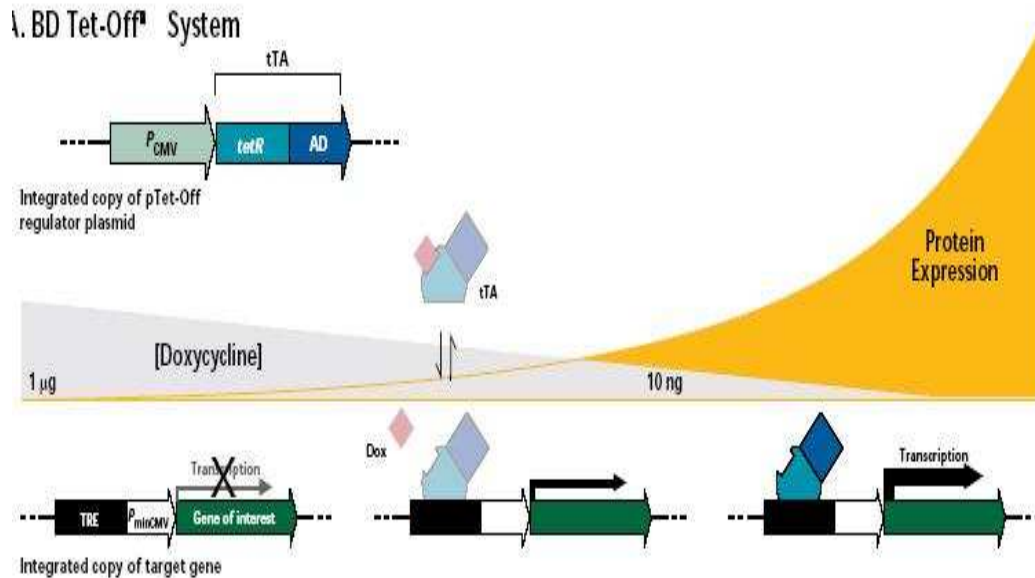


Figura 2. Esquema del sistema Tet-off (Clontech).

Primero transfectamos las células con el plásmido pTET. Para transfectar las células se utilizó la electroporación. Ya que éste plásmido lleva el cassette NEO de resistencia a la geneticina, sometimos a las células a G-418 (0.5mg/ml). Luego las células resistentes a geneticina se transfectaron con el plásmido pTRE, que, como lleva el gen de resistencia a higromicina, se pudieron seleccionar las células tras someterlas a ésta.

Para disminuir los niveles de la proteína Bcl-2 en células B16/Tet-Bcl-2, se cultivaban éstas en presencia de 2 μg de tetraciclina (Sigma) por cada millón de células.

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 biotinilado se utilizó el kit de marcaje con biotina (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante y el anticuerpo anti-Bcl-2 de ratón (Invitrogen)]. 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 de varios lavados, 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 que contiene ácido sulfúrico 0,5 M (Chemicon). 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.

También se analizaron los niveles de dicha proteína por citometría de flujo usando un citómetro EPICS PROFILE II (Coulter Electronics) a 488 nm y 250 milivatios. La suspensión celular fue diluida a 250000 células/ml. Para la determinación de los niveles de Bcl-2, se utilizaron un anticuerpo primario de ratón anti-Bcl-2 seguido de un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG biotinilado y ficoeritrina unida a

estreptoavidina (Sigma). Los niveles de la proteína Bcl-2 se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (Δ FL1). La viabilidad celular se determinó mediante yoduro de propidio (concentración final de 10 μ M, Sigma).

9. Tratamiento de las células B16M con oligonucleótidos y TNF- α .

Las células B16M fueron incubadas durante tres días en la presencia de 50 μ M del oligonucleótido fosforotioato (ODN) antisentido del mRNA que codifica para la Bcl-2 (*bcl-2-AS*) y para la Mn-SOD (*SOD2-AS*) (Eurobio). La adición de los oligonucleótidos se realizó diariamente comenzando a las 24 horas tras la siembra, mezclándolo con lipofectina (Invitrogen) en una relación 1:1. La secuencia de *bcl-2-AS* corresponde con el sitio de inicio de la traducción de *bcl-2* murino y se extiende hacia el extremo 3' hasta un total de 18 bases (5'-TCTCCCGGCTTGCGCCAT-3'). También se utilizó un oligonucleótido con dos bases modificadas como control (5'-TCTCCCGGCATGTGCCAT-3'). La secuencia de *SOD2-AS* fue 5'-CACGCCGCCGACACAACATTG-3' y se utilizó como control un oligonucleótido con seis bases modificadas (5'-CACTCCTCCCAGCACAACAGTC-3').

El TNF- α recombinante murino se obtuvo de Sigma a una concentración de 2x10⁷ U/ml. Se realizaron soluciones stock a 5x10⁵ U/ml en solución salina al 0,9%, ajustada a pH7.0, y 4 °C. rmTNF- α (50U/ml)

se añadió en todos los casos al medio de cultivo tras 24 horas de la siembra de células.

10. Citometría de flujo.

Los análisis se realizaron con un citómetro EPICS PROFILE II (Coulter Electronics) a 488 nm y 250 milivatios. La suspensión celular fue diluida a 250000 células/ml. La determinación de Bcl-2 se llevó a cabo como se explica en el apartado 7 de esta misma sección.

La generación de $O_2^{\cdot-}$ fue determinada en células viables usando dihidroetidio (2mg/ml, Sigma) que entra en las células donde es oxidado por el $O_2^{\cdot-}$ hasta producir etidio, que se une al DNA produciendo fluorescencia (Rothe, G., and Valet, G. (1990) *Leukocyte Biol.* 47, 440-448).

11. Electroporación y selección de los clones de B16M *knockout* para las proteínas de multirresistencia a fármacos (MRP).

Las secuencias genómicas de las MRP murinas se aislaron de la librería del fago λ Charon 35 construida con DNA de la cepa murina C57BL/6J.

Formación del vector diana: un tramo de DNA de 6 Kb con XbaI que contenía exones del gen de MRP se subclonó en el plásmido pBLUEScriptII para generar el vector con el gen diana en el que se reemplazó un fragmento SmaI-BamHI con un cassette NEO (resistencia a

la genética o neomicina) de 1,6Kb. El cassette del gen de la timidina quinasa (TK) fue introducido dentro de un sitio de restricción NotI-XhoI.

Electroporación y selección de clones *knockout*: se linealizó el vector con el gen diana por digestión con NotI e introducido por electroporación (condiciones: voltaje, 250V; capacitancia, 850 μ F y tiempo, 27 ms) en las células B16M-F10; los clones se seleccionaron con G-418 (genética, 0.5mg/ml) y ganciclovir por la presencia de NEO y la pérdida del gen TK.

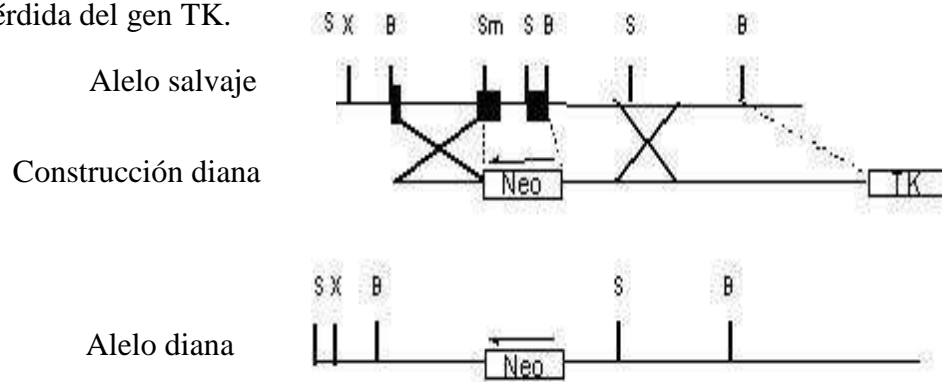


Figura 3. Construcción de *Knockout* para MRP1.

Se analizaron los clones para ver cuales portaban la mutación en el gen de MRP mediante primero una PCR y después por confirmación con análisis por DNA blot. Los dobles *knockout* para MRP se obtuvieron por exposición de uno de los clones *knockout* simple a altas concentraciones de G-418 durante dos semanas.

12. Western Blots.

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 (Ortega y cols, 2003). Se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CFTR (CF3) de (Novus Biologicals) que reconoce la secuencia comprendida entre los aminoácidos residuales 103 a 1117 que se encuentran en la primera vuelta extracelular de la proteína CFTR humana, conservada en ratón. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP). 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).

En el caso de la determinación de citocromo c, se lavaron las células tumorales con PBS y el pellet se resuspendió en tampón homogenizador en hielo (2x10⁶ células/ml de tampón; 20mM HEPES, pH 7,5, 250mM de sacarosa, 1 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM de EDTA, 1mM EGT, 1 mM ditiotreitól, 0,1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, y 10

$\mu\text{g/ml}$ de leptinina, aprotinina y pepstatina A). Tras la homogenización, las muestras se centrifugaron a 2500g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante estaba constituido por la fracción soluble citosólica. Se cuantificaron las proteínas por Bradford, se separaron mediante un SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-citocromo c (Santa Cruz Biotechnology). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo (anti-cabra) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP). Las bandas se cuantificaron mediante quimioluminiscencia con el densitómetro Fujifilm NAS-1000.

13. RT- PCR y PCR cuantitativa.

γ -GCS y Mn-SOD: el análisis de la expresión de γ -GCS y Mn-SOD se llevó a cabo aislando primero el RNA total con el Kit de Quiagen RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se obtuvo utilizando *primers* aleatorios (*random hexamer primer*) y el kit de transcripción inversa (Multiscribe Reverse Transcriptase kit) como describe el fabricante (Taqman reverse reverse transcription reagents, Applied Biosystems, Foster City, CA). Después se realizó una PCR utilizando *primers* específicos y la Taq polimerasa (AmpliTaq Gold DNA polymerase; Applied Biosystems). Las secuencias de los *primers* utilizados fueron las siguientes:

γ -GCS-HS

Forward: 5' ATCCTCCAGTTCCTGCACATCTAC

Reverse: 5' GATCGAAGGACACCAACATGTACTC

γ -GCS-LS

Forward: 5' TGGAGTTGCACAGCTGGACTCT

Reverse: 5' CCAGTAAGGCTGTAAATGCTCCAA

SOD2

Forward: 5'-CCTGAACATCAACGAGGAGAAG

Reverse:5'-CTCCCAGTTGATTACATTCCAA

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

Forward: 5' CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG

Reverse: 5' GGTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG

Para la detección de los amplicones se utilizó como marcador fluorescente SYBR Green I y el termociclador iCycler (Biorad, Hercules, CA). Cada una de los cDNA diana se amplificó por separado con las siguientes condiciones de PCR: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 30 segundos, hibridación y extensión a 60°C durante 1 minuto por ciclo). El incremento de la fluorescencia se midió a tiempo real durante la extensión.

La PCR cuantitativa para la γ -GCS-HS, la γ -GCS-LS y Mn-SOD se relativizó a la expresión de la G3PDH. El incremento de la fluorescencia se midió a tiempo real durante los ciclos. Se determinó el Thershold cycle

(C_T) y con ello, la expresión relativa de los genes se expresó como se muestra a continuación:

$$2^{(-\Delta\Delta C_T)} \text{ siendo } \Delta C_T = C_{T\text{diana}} - C_{T\text{G3PDH}}, \text{ y } \Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{\text{tratado}} - (\Delta C_T)_{\text{control}}.$$

CFTR: en el caso de esta proteína, se realizó una RT-PCR para obtener el cDNA con el que se realizaría un Northern blot (apartado siguiente). El cDNA de la CFTR se obtuvo usando random *primers* y el Kit MultiScribe Reverse Transcriptase siguiendo las instrucciones del fabricante (Taiman RT Reagents). Se amplificaron con la polimerasa de DNA AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) 392 pares de bases correspondientes con los nucleótidos 1340-1730 del gen murino de CFTR mediante los primer que contenían la siguiente secuencia:

Forward: 5'-GGGAGGAGGGATTTGGGGAA-3'

Reverse: 5'-GTGATGTCCTGCTGTAGTTG-3'

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 (PerkinElmer Life Sciences).

14. Northern blot.

El RNA total fue aislado con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 10 μg del RNA total para la electrofóresis en gel de agarosa al 1%. El RNA se transfirió a una membrana de nylon (Amershan bioscience) a la que se unió el RNA covalentemente utilizando UV. Los cDNAs de la proteína murina CFTR y el control gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PDH, Clontech) fueron marcados con ^{32}P (Feinberg y

Vogelstein,1983). Las membranas fueron hibridadas a 65°C con los fragmentos de cDNA marcados radioactivamente. Después de lavar a temperatura ambiente, los filtros fueron revelados utilizando un PhosphorImager (Bio-Rad).

15. Crecimiento local del tumor.

Las células B16M-F10 fueron levantadas de los frascos de cultivos utilizando EDTA (2mM en tampón fosfato salino, PBS) durante 5 minutos a 37°C. Se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio Dulbecco (DMEM). Tras este paso, se inyectaron en la extremidad trasera derecha a una concentración de 10^4 células/20 μ l. El crecimiento del tumor se medía cada dos días con un pie de rey. El tamaño tumoral se midió calculando la siguiente fórmula:

[diámetro de la pata con el tumor- diámetro de la pata contralateral tratada con DMEM]



Figura 4. Inoculación de las células B16M-F10 en la pata de ratones C57BL/6J.

16. Metástasis experimental.

Se inyectaron vía porta 10^5 células viables B16M suspendidas en 50 μ l de DMEM en ratones anestesiados con 30 μ l de una solución compuesta por 75 μ g/g Ketamina junto con 1 μ g/g Medetomidina. A los diez días de la inoculación se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Los hígados se fijaron por inmersión en paraformaldehído 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 μ m. 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 10 mM, a 120 ° C durante 18 segundos.

Se determinaron dos parámetros (Carretero y cols., 1999):

- Densidad metastática: número medio de focos/100mm³ de hígado detectado en 15 secciones de 10x10mm² por hígado.
- Volumen metastático: porcentaje medio de volumen de hígado ocupado por la metástasis.

17. Aislamiento *in vivo* de células B16M-F10 provenientes de estudios.

El aislamiento de las células B16M-F10 adaptadas a la Gln⁺ (B16M-F10-Gln⁺) se realizó mediante disgregación enzimática, incubación con el anticuerpo monoclonal murino anti-Met 72 y citometría de flujo acoplada a “cell sorting”. El anti-Met-72 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 consiguió 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 “sorting” (MoFlo System, Dako Cytomation) (Ortega y cols., 2003b).

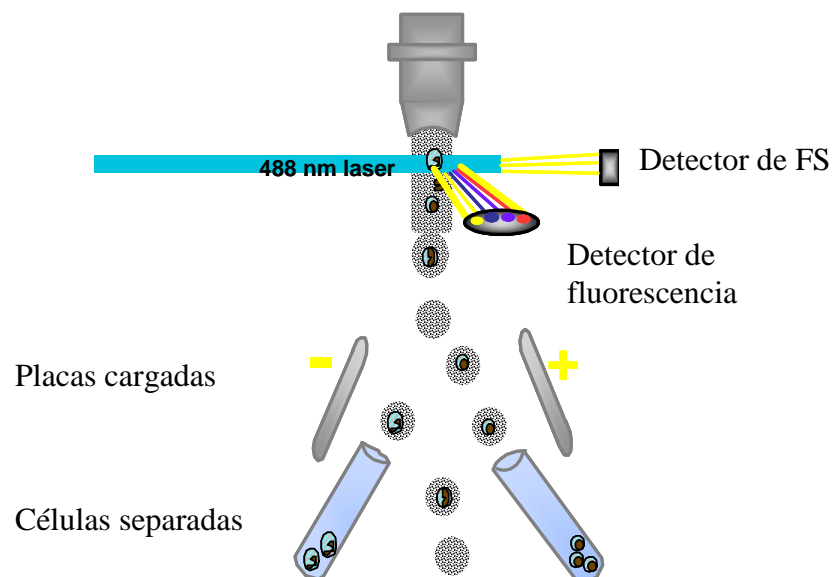


Figura 5. Separación de las células B16M-Gln⁺ mediante “cell sorting”.

18. Aislamiento y cultivo de las células del endotelio sinusoidal hepático.

El endotelio sinusoidal hepático (HSE) fue separado e identificado como describió (Vidal-Vanaclocha y cols., 1993). El aislamiento de las células sinusoidales del hígado de ratón se llevó a cabo en tres etapas básicas:

18.1. Preparación de soluciones enzimáticas.

- Tampón Krebs-Henseleit. Se utilizó para la eliminación de la sangre intrahepática y para los lavados del tejido disgregado, así como para las soluciones enzimáticas.

- Solución A: 10 ml de pronasa tipo E (Boehringer, Mannheim, Alemania) al 0.1% (p/v).

- Solución B: 15 ml de pronasa al 0.033% y colagenasa A (Boehringer, Mannheim, Alemania) al 0.083% (p/v).

- Solución C: 13 ml de pronasa al 0.038%, colagenasa A al 0.038% y DNasa I al 0.0005% (deoxirribonucleasa tipo I; Sigma, St. Louis, MO) (p/v).

18.2 .Digestión enzimática y disgregación del tejido.

Los animales fueron anestesiados con quetamina (Ketolar 50mg/ml, Parke-Davis) y acepromacina (Calmo-neosan 5g/100ml, Neosan). Las dosis administradas fueron de 150mg/kg de quetamina y 5 mg/kg de acepromacina. Esta última además de actuar como anestésico actúa 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 tampón Krebs-Henseleit. Tras el lavado del hígado 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 una maya de nylon. El filtrado se repartió en 2 tubos corning de 50ml y se centrifugó a 450g durante 5 minutos a 4°C. Se realizó un segundo lavado en las mismas condiciones.

18.3. Separación de las células sinusoidales hepáticas mediante 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 tripán.

Para el cultivo de las células sinusoidales hepáticas se sembraron sobre una matriz de colágeno tipo I al 1%. Se utilizaron placas de 12

pocillos a las que se añadió una solución de colágeno a razón de 2ml/pocillo. Tras su incubación a 37°C durante al menos 30 minutos las células aisladas lavadas se sembraron directamente. Las células se sembraron y cultivaron con DMEM (Invitrogen) pH 7.4, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Invitrogen) a una concentración de 5×10^5 células/cm².

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 se unen a la matriz de colágeno, obteniéndose tras el lavado, un cultivo casi exclusivo de células endoteliales. Los otros tipos de células sinusoidales como células de Kupffer, células estrelladas y linfocitos se eliminan con los lavados. Las células endoteliales se mantuvieron en el medio de cultivo durante al menos 12 horas. Previamente a la realización de cualquier experimento las células fueron mantenidas en medio sin suero durante al menos 4 horas. En estas condiciones las células podían ser mantenidas de 4 a 5 días como máximo, a partir de los cuales las células comenzaban a perder sus características.

19. Ensayos de citotoxicidad y adhesión B16M-células endoteliales.

Para la cuantificación de la adhesión tumoral al endotelio se incubaron las B16M con acetoximetiléster 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5- y -6-carboxifluoresceína (BCECF-AM; Molecular Probes, Eugene, OR) (10^6 células se incubaron en 1ml de DMEM y con 50µg/ml de BCECF-AM y

5µl de DMSO, durante 20 minutos a 37°C). Tras lavar, las células que contenían BCECF-AM con PBS se resuspendieron en DMEM sin rojo fenol a una concentración de 2.5×10^6 células /ml. 0.2ml de esta suspensión celular se añadieron a pocillos con células endoteliales sembradas 24 horas antes, así como a pocillos control (sin ningún tipo de tratamiento) y pocillos control sin células endoteliales para el cálculo de la adhesión inespecífica de las células tumorales sobre la matriz de colágeno tipo I.

Las placas se incubaron durante 20 minutos a 37°C y se leyó la fluorescencia con un lector de placas (Fluoroskan Ascent FL; Labsystem, Manchester, UK) a una longitud de onda de excitación de 488nm y se registró la fluorescencia emitida a 530nm. A continuación se realizaron 3 lavados con medio para eliminar las células tumorales no adheridas a la monocapa de células endoteliales y se volvió a medir la fluorescencia emitida. Así pues en cada pocillo se pudo determinar un valor relativo en unidades de fluorescencia arbitrarias basadas en el porcentaje de células B16M añadidas inicialmente a los cultivos de HSE.

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. Nunca se realizaron los experimentos con cultivos de células endoteliales que ocuparon una superficie menor del 70%.

% de 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

% de 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.

$$\% \text{ Adhesión específica (AE)} = AT - (AI \times SE)$$

El daño que sufren las células B16M durante su adhesión *in vitro* al HSE se midió como previamente se había descrito en la bibliografía (Anasagasti y cols., 1998). Se marcaron las células tumorales con calceína-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se resuspendieron en DMEM sin rojo fenol a una concentración de 2.5×10^6 células /ml. Se añadieron 0.2ml de esta suspensión celular a pocillos con células endoteliales sembradas 24 horas antes y a pocillos control sin células endoteliales pretratadas con colágeno. Se determinó la fluorescencia emitida por cada uno de los pocillos tras la adición de las células tumorales ($\lambda_{exc}=488$; $\lambda_{em}=522$). Se incubaron las placas durante 20 minutos a 37°C y tras el lavado con medio fresco se volvió a medir la fluorescencia. La *citotoxicidad relativa* se calculó de la siguiente manera:

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

20. Microscopía *in vivo*.

Para seguir a las células metastáticas dentro del hígado, se utilizaron células marcadas con calceína-AM (Molecular Probes) (Anasagasti y cols., 1998). El número total de células marcadas por lóbulo hepático fue seguido en 10 diferentes secciones por lóbulo e hígado cada 15 minutos durante seis horas. Para ello se utilizó un microscopio Eclipse E600FN, equipado con una cámara digital DXM1200 (Nikon).

21. Estudio de la muerte celular por apoptosis y tinción con hematoxilina.

Para poder llevar a cabo estas técnicas, se procesaron los hígados como se indican en el apartado 15 de “material y métodos”. Una vez obtenidos los cortes en portaobjetos se pasó a realizar en dichos cortes el TUNEL y la tinción de contraste de hematoxilina.

La técnica de TUNEL (*TdT-mediated X-dUTP nick end labeling*) se desarrolló para observar el DNA fragmentado de las células apoptóticas. Se utilizó para ello el kit TUNEL de la casa comercial Roche, basándose en una inmunohistoquímica donde el segundo anticuerpo está marcado con HRP y el revelado se realiza incubando los cortes con diaminobenzimida (DAB).

Como tinción de contraste se utiliza una solución de hematoxilina de Mayer (Merck) al 80% previamente filtrada de 3 minutos.

22. Determinación caspasa 3.

Para medir esta actividad se utilizó el sustrato colorimétrico N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilido siguiendo los pasos indicados por el fabricante (Calbiochem). Para ello, primero se lisaron las células con tampón de lisis (50Mm HEPES A Ph 7,4, 100Mm NaCl, 0,1% CHAPS, 1Mm ditioneitol, 0,1 Mm EDTA, y 10% de glicerol) a 37°C durante 10 minutos. Tras este tiempo se añadió N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilina a una concentración de 200 µM en las muestras, que tras su escisión por parte de la caspasa 3, libera *p*-nitroanilina que absorbe a 405nm. Se midió la mezcla a 405nm cada 20 minutos durante tres horas. Se calculó la actividad enzimática siguiendo las indicaciones del fabricante como pmol/min.

23. Fraccionamiento celular de B16M-F10 e iB16M.

Las células fueron levantadas de los frascos de cultivos utilizando EDTA (2mM en tampón fosfato salino, PBS) durante 5 minutos a 37°C. Se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en Krebs-Henseleit (pH 7.4). Tras la ruptura celular mediante un tratamiento con digitonina (1.6mM) se separaron los compartimentos citosólico y mitocondrial mediante una centrifugación a través de una capa de aceite de silicona (AR200/SF96:100, 6:1, v/v) (Ortega y cols., 2003b). Tras la separación de los compartimentos citosólico y mitocondrial más del 96% de la actividad lactato deshidrogenasa se encontraba en el sobrenadante (fracción citosólica). Esto significa que se ha producido una ruptura total de las

membranas citoplasmáticas y por ello se observa un alto nivel de esta actividad enzimática. Por otra parte, el fraccionamiento con digitonina no daña las mitocondrias como se indica en Obrador y cols (1997).

24. Análisis de los datos.

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 0.05.

RESULTADOS

1. Mecanismos moleculares que canalizan la salida de GSH en células B16M-F10: MRP1 y un transportador dependiente de Bcl-2.

En primer lugar se estudió si, en células con fenotipo metastático, el mecanismo de transporte de GSH al espacio extracelular era dependiente de L-metionina [previamente detectado en hepatocitos (Aw y cols., 1984, , 1986)]; al realizar los experimentos se observó que en las células metastáticas B16M-F10 también existía un sistema de liberación de GSH sensible a L-metionina, ya que cuando se añadió el aminoácido al medio de cultivo, la salida de GSH disminuyó (Tabla I).

Como ya se ha descrito en la introducción, existe una correlación positiva entre niveles de Bcl-2 y GSH, por ello, también se estudió cómo variaba la liberación de GSH en células que sobreexpresaban Bcl-2 con respecto a células con una expresión menor. En estos experimentos pudimos observar como el tratamiento con L-metionina en las células que sobreexpresaban Bcl-2 (B16M-F10/Tet-Bcl-2) no producía diferencias significativas en la velocidad de liberación del tripéptido con respecto a las células que expresan niveles de Bcl-2 control tratadas también con L-metionina (0.7 ± 0.3 y 0.7 ± 0.2 nmol/ 10^6 células x h, respectivamente). Estos hechos indican que tanto la proteína Bcl-2 como L-metionina actúan sobre el mismo sistema de transporte ya que no hay una mayor disminución en la salida de GSH al estar presentes ambas moléculas.

Salida de GSH de las células B16M-F10 dependiente de L-metionina- y MRP

Adiciones	B16M -F10			
	Control		Tet-Bcl-2	
	GSH (nmol/10 ⁶ células)	salida GSH (nmol/10 ⁶ célulasxh)	GSH (nmol/10 ⁶ células)	salida GSH (nmol/10 ⁶ célulasxh)
Ninguna	32±4 ^b	1.8±0.3 ^a	45±5 ^a	0.9±0.3 ^a
Metionina (1mM)	47±3 ^a	0.7±0.2 ^b	48±3 ^a	0.7±0.3 ^a
MRP-/-1	45±5 ^a	1.0±0.2 ^b	49±5 ^a	0.1±0.05 ^b
MRP-/-2	33±4 ^b	1.7±0.2 ^a	46±6 ^a	0.8±0.2 ^a
Metionina (1mM) + MRP-/-1	48±5 ^a	0.1±0.05 ^c	49±4 ^a	0.07±0.03 ^b

Tabla I. Las células se cultivaron durante 24h. Algunas placas se utilizaron para estudiar el flujo de salida de GSH, tomando alícuotas del medio cada 30 minutos y llevándolas a hielo; una parte de las alícuotas se utilizó para medir el glutatión total, mientras que la otra se mezcló con ácido perclórico frío (12%) que contenía 40 mM de NEM y 2 mM de ácido disulfónico de batofenantrolina para prevenir la oxidación de GSH y medir el GSSG acumulado. Para que el GSH extracelular no fuera degradado, se utilizó el inhibidor de la γ -GT, ACV, presente en el medio de cultivo a una concentración de 10 μ M tres horas antes de la medida (tiempo suficiente para poder medir la salida de GSH al espacio extracelular sin que sea degradado por la γ -GT para utilizar *de novo* los precursores en la síntesis de GSH). Otros frascos de cultivos se utilizaron para la determinación de Bcl-2, GSH y GSSG.

Para comparar los grupos de resultados estadísticamente, se utilizó un análisis de ANOVA de un solo factor. Los resultados se muestran en la tabla como media más

Resultados

desviación típica de seis experimentos diferentes. Las diferencias estadísticas entre las letras en formato superíndice dentro de cada columna se expresan con un $p < 0,01$.

Como se ha indicado anteriormente la MRP1 es una defensa tumoral ya que facilita el transporte al espacio extracelular de fármacos antitumorales (apartado 5.1.2. de “Introducción”).

Se realizaron experimentos con clones *knockout* para MRP1 (MRP1 -/-) con la finalidad de conocer su papel en la tasa de liberación de GSH. Dichos clones mostraron un flujo de GSH disminuido respecto al control. Esta disminución fue todavía mayor cuando los clones sobreexpresaban Bcl-2 (MRP1-/- B16M-F10/Tet-Bcl-2); de hecho, en esta condición la liberación de GSH fue prácticamente nula (Tabla 1). Los resultados fueron similares cuando los clones MRP1-/- B16M-F10 se incubaron en presencia de L-metionina.

Así pues, nuestros resultados permitían concluir que la liberación de GSH por las células B16M-F10 se lleva a cabo por dos sistema complejo: uno dependiente de Bcl-2 y sensible a L-metionina, y otro correspondiente a MRP1. Por lo tanto, nos planteamos identificar el mecanismo molecular Bcl-2-dependiente..

2. Estudio del canal dependiente de Bcl-2.

Se realizaron estudios donde se investigó otro mecanismo relacionado con la salida de GSH al espacio extracelular (indicado en el apartado 5.1.2. de la introducción), la proteína CFTR (Linsdell y Hanrahan, 1998) y que se ha encontrado en gran variedad de tipos celulares (Jungas y cols., 2002). En los experimentos que se llevaron a cabo se utilizaron células MRP1^{-/-} y *bcl-2-AS*, para estudiar si, aparte de estos mecanismos, CFTR estaba también implicada en la salida de GSH de las células B16M-F10.

Se estudió *in vitro* en células B16M-F10 el flujo de salida de GSH intracelular bajo diferentes condiciones (figura 1). Aquí se puede ver cómo la salida de GSH intracelular aumenta en las células tratadas con *bcl-2-AS*, mientras que el flujo disminuye hasta un 50% de los valores control en los clones *knockout* para MRP1. Al añadir un anticuerpo contra CFTR, se observó que disminuía la tasa de salida de GSH al espacio extracelular.

El siguiente paso fue tratar con el anticuerpo para CFTR a las células pretratadas con el antisentido y se vio que los niveles de inhibición del escape de GSH eran similares a los de las células tratadas sólo con el anticuerpo para CFTR, sugiriendo que CFTR se corresponde con el canal dependiente de Bcl-2. Cuando se añadía el anticuerpo a células MRP1^{-/-} tratadas con *bcl-2-AS* (es decir, células deficientes de MRP1, sin apenas Bcl-2 y con el canal CFTR inhibido), el flujo de GSH era prácticamente abolido.

Efectos del anticuerpo anti-CFTR sobre el eflujo de GSH en células B16M-F10.

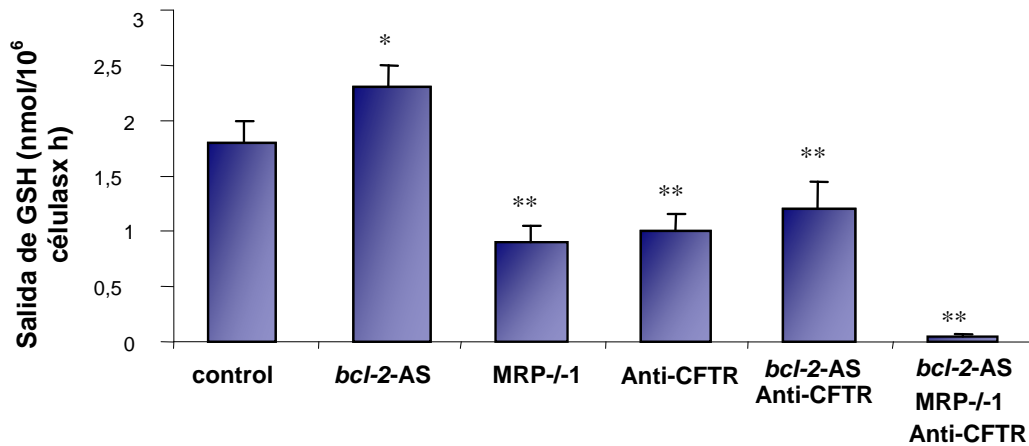


Figura 1. Las células B16M-F10 y MRP1-/- B16M-F10 se cultivaron durante tres días en presencia de *bcl-2-AS* y después se volvieron a sembrar durante 24 horas en ausencia del oligo. A las 12 horas de la siembra, se añadió el anticuerpo anti-CFTR. Los niveles de Bcl-2 en el control y en las células tratadas con el antisentido fueron 30 ± 6 y 1 ± 0.5 unidades/mg de proteína, respectivamente ($n= 4-5$ en cada caso; con $p < 0.01$). Cuando se substituyó *bcl-2-AS* por un antisentido control no se vieron diferencias significativas con respecto al control, ni en presencia de anti-CFTR, por ello no se muestran los resultados. Los datos se muestran como media más desviación típica para 5 experimentos independientes. Se realizó un test de Student para comparar cada grupo con el control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

Uno de los pasos necesarios para la activación de CFTR es una fosforilación de unos residuos de serina mediada por la proteína quinasa A (PKA) (Chappe y cols., 2005; McDonald y cols., 1995) y por la proteína quinasa C, aunque en menor medida (Gadsby y Nairn, 1999). La expresión basal del gen de CFTR es dependiente de la actividad PKA (McDonald y cols., 1995). De hecho, el tratamiento de células de carcinoma humano de colon T84 con el inhibidor selectivo de PKA. N-[2-(p-

bromocinnamilamina) etil-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), causó una completa supresión de la expresión del gen de CFTR sin afectar a otros genes de expresión constitutiva (McDonald y cols, 1995). Por ello, se estudió los posibles efectos inhibidores que tendrían una anulación de esa fosforilación utilizando para ello el inhibidor de la PKA, H-89.

Mediante un Northern (figura 2) pudimos ver cómo H-89 inhibía la expresión de CFTR en células B16M-F10 normales y *knockout* para MRP1.

Inhibición de CFTR por H-89.

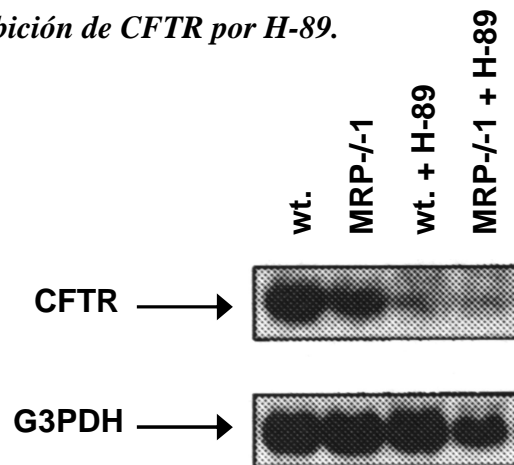


Figura 2. H-89 (30 μ M) se añadió a las células 24 horas tras la siembra (McDonald y cols, 1995). El RNA total se aisló 24 horas después y se procedió a realizar el northern blot (10 μ g de RNA).

Para corroborar el mecanismo de acción de CFTR en la liberación de GSH, se realizaron los experimentos mostrados en la tabla II.

***Efectos de la inhibición de CFTR por parte de la molécula H-89
sobre el eflujo de GSH.***

Condiciones	Eflujo GSH
	nmol/10 ⁶ células x h
Control	1.7±0.2
MRP 1-/-	0.8±0.2
H-89	1.0±0.15
H-89 + MRP 1 -/-	0.04±0.02

Tabla II. H-89 (30 μ M) se añadió al medio de cultivo 24 horas tras la siembra. 24 horas después se analizó y cuantificó la salida de GSH al espacio extracelular. Los datos se muestran como media \pm SD para un total de cuatro experimentos independientes. Se realizó una *t* de Student comparando cada condición con el control. Al compararlos con el control, todos los grupos fueron diferentes significativamente ($p < 0.01$).

Se puede ver que las tasas de eflujo de GSH son similares comparando los dos controles y las células MRP1 -/- en los dos experimentos (figura 1 y tabla II). También se observó que para las células tratadas con H-89 (tabla II), las tasas de salida de GSH fueron similares a los que se encontraron al utilizar un anticuerpo anti-CFTR (figura 1). Y, por último, se vio que los niveles encontrados en las células *knockout* para MRP1 y tratadas con H-89, se correspondían con un 98% aproximadamente de disminución del flujo de GSH. Todos estos resultados indican que CFTR está directamente involucrado en el transporte de GSH desde el citosol al espacio extracelular y que este mecanismo es un canal sensible a Bcl-2.

3. Aceleración del eflujo de GSH en células B16M-F10 inducidas por el oligonucleótido antisentido anti-*bcl-2* y verapamil.

Una vez estudiados los mecanismos de transporte de GSH, se realizaron una serie de experimentos para encontrar un modo de acelerar la salida. A tal efecto, se utilizó un modulador de MRP1 (Tsuruo y cols., 1981); el transporte activo de GSH vía MRP1 puede ser estimulado por VRP (Cullen y cols., 2001; Laberge y cols., 2007). Con el objeto de potenciar la salida de GSH en las células B16M-F10, estudiamos los efectos de la combinación de VRP y *bcl-2*-AS. Se utilizó una concentración de VRP de 1 μ M que corresponde a niveles plasmáticos clínicamente aceptados y no tóxicos (Raderer y Scheithauer, 1993).

Se puede observar que tanto *bcl-2*-AS como VRP, por separado, incrementaron las velocidades de salida de GSH y que la combinación de ambos tiene efectos aditivos y constantes a lo largo de las doce horas de perfusión (tabla III). El contenido de GSH intracelular disminuyó significativamente, comparado con controles, en el caso de tratamiento con *bcl-2*-AS y VRP a las 6 horas de perfusión. Sin embargo a las 12 horas de la perfusión los niveles de GSH fueron superiores en un 70% a los controles en el tratamiento con *bcl-2*-AS y VRP. Estos resultados muestran la posibilidad de que la pérdida de GSH acelere su velocidad de síntesis intracelular, como ocurre en el caso de una depleción de los niveles de GSH con BSO (100 μ M o menos) (Carretero y cols., 1999).

Contenido y liberación de GSH en células B16M -F10 tratadas con *bcl-2-AS* y VRP.

Adiciones	Perifusión Tiempo (h)...	Eflujo de GSH (nmol/10 ⁶ células x h)			GSH (nmol/10 ⁶ células)		
		1 h	6 h	12 h	1 h	6 h	12 h
		Ninguna	1.3±0.1 ^c	1.3±0.2 ^c	1.5±0.2 ^{bc}	30±3 ^b	34±3 ^b
<i>bcl-2-AS</i>	1.8±0.3 ^b	1.7±0.3 ^b	1.9±0.3 ^{ab}	28±2 ^{bc}	29±4 ^b	32±5 ^b	
VRP	2.0±0.3 ^{ab}	2.1±0.3 ^{ab}	2.2±0.2 ^{ab}	26±3 ^{bc}	26±2 ^{bc}	34±3 ^b	
<i>bcl-2-AS+VRP</i>	2.4±0.4 ^a	2.6±0.4 ^a	2.9±0.3 ^a	25±3 ^c	24±2 ^c	46±5 ^a	

Tabla III. Los experimentos se realizaron con una cámara de perifusión que contenía células que previamente se cultivaron durante 3 días en presencia o ausencia de *bcl-2-AS* (50 µM) o de un oligonucleótido control; tras este tiempo, se sembraron y cultivaron de nuevo durante 24 horas en ausencia de oligos. Para medir la velocidad de salida de GSH, se tomaron alícuotas de 2 ml cada 30 minutos, empezando a los tiempos de perifusión indicados en la tabla y se llevaron a hielo. Un ml se utilizó para medir el glutatión total, mientras que el otro ml se mezcló con 1 ml de ácido perclórico frío (12%) que contenía 40 mM de NEM y 2 mM de ácido disulfónico de batofenantrolina (para prevenir la oxidación de GSH y poder determinar con fiabilidad el GSSG acumulado). Antes de realizar las determinaciones, las muestras se concentraron 40 veces, una vez neutralizado el ácido, mediante centrifugación en vacío a 4°C. Los cálculos de GSH se realizaron de la siguiente manera: $GSH = 2x$ (glutatión total-GSSG).

No se encontraron diferencias significativas entre el control y las células tratadas con el oligonucleótido control. Los datos se presentan como media ± desviación típica para siete experimentos independientes. Para comparar los distintos tratamientos y los tiempos de medición se utilizó una ANOVA de dos factores. Las letras indican entre ellas diferencias significativas entre las condiciones y tiempos ($p < 0,05$). El grupo *a, b* indica aquellos resultados que no se pueden diferenciar estadísticamente ni de *a* ni de *b*; y *b, c* son aquellos resultados que no se pueden diferenciar ni del grupo *b* ni del grupo *c*.

4. Asociación de la aceleración del eflujo de GSH con una sobreexpresión de la γ -glutamilcisteína sintetasa en células B16M-F10.

Se puede observar en la tabla IV que tanto el tratamiento con *bcl-2-AS* como con VRP incrementaron significativamente la velocidad de síntesis de GSH, pareciendo ser sus efectos aditivos y asociados a un incremento de la actividad γ -GCS. Más aún, el incremento en la actividad γ -GCS estaba acompañado por un aumento tanto en la expresión de la subunidad γ -GCS-HS como de la γ -GCS-LS (tabla V). Con lo que el aumento de la salida de GSH estaba asociado con una sobreexpresión de γ -GCS.

Síntesis de GSH en células B16M-F10 sometidas a tratamientos de aceleración de salida de GSH celular.

Adiciones	Tiempo Perifusión (h)...	Síntesis GSH (nmol/10 ⁶ células x h)		Actividad γ -GCS (mU/10 ⁶ células)	
		6 h	12 h	6 h	12 h
		Ninguna	1.4±0.3 ^c	1.2±0.3 ^c	185±24 ^c
<i>bcl-2-AS</i>	1.2±0.2 ^c	2.0±0.2 ^b	168±31 ^c	255±21 ^b	
VRP	1.0±0.3 ^c	2.5±0.4 ^b	176±40 ^c	294±47 ^b	
<i>bcl-2-AS +VRP</i>	1.3±0.4 ^c	4.0±0.5 ^a	154±28 ^c	405±44 ^a	

Tabla IV. Para este estudio, las células se sembraron y cultivaron como se indica en la leyenda de la tabla III. Para el estudio de la síntesis de GSH, las muestras de

Resultados

células que fueron extraídas de la cámara de perfusión, se lavaron, centrifugaron (a 1500 r.p.m. y 4°C) y resuspendieron en tampón Krebs-Henseleit frío, pH 7.4, con glucosa 5mM y SBF 2% e incubaron en erlenmeyers durante 60 minutos a 37°C en presencia de aminoácidos precursores necesarios para la síntesis de GSH [L-Gln (5 mM), Gly (2 mM), L-Ser (1 mM) y N-acetilcisteína (1 mM)]. La síntesis de GSH fue calculada a partir del contenido total de GSH a los minutos 0, 20, 40 y 60 de la incubación. La actividad de la GSH-S en los controles fue de 15 ± 3 mU/10⁶ células, dicho valor no varió significativamente a lo largo de la perfusión independientemente de la presencia de *bcl-2-AS* y/o VRP. Los datos se presentan como media \pm desviación típica para ocho experimentos independientes. Para comparar los distintos tratamientos y los tiempos de medición se utilizó una ANOVA de dos factores comparando entre los distintos tiempos y las condiciones. Las letras indican entre ellas diferencias significativas ($p < 0,01$).

Aceleración de la salida de GSH asociado con una sobreexpresión de γ GCS en células B16M-F10.

Adiciones	Tiempo Perifusión(h)...	γ -GCS-HS		γ -GCS-LS	
		3 h	6 h	3 h	6 h
Ninguna		1.0 \pm 0.1 ^c	1.1 \pm 0.2 ^c	1.2 \pm 0.1 ^c	0.9 \pm 0.1 ^c
<i>bcl-2-AS</i>		1.9 \pm 0.2 ^b	1.1 \pm 0.3 ^c	1.8 \pm 0.3 ^b	1.0 \pm 0.2 ^c
VRP		2.2 \pm 0.3 ^b	1.4 \pm 0.2 ^{bc}	1.9 \pm 0.2 ^b	1.2 \pm 0.1 ^c
<i>bcl-2-AS</i> +VRP		3.2 \pm 0.5 ^a	1.8 \pm 0.3 ^b	2.7 \pm 0.4 ^a	1.5 \pm 0.2 ^b

Tabla V. Las células se cultivaron y perfundieron como se explica en la tabla III. La expresión de γ -GCS-HS y γ -GCS-LS se determinó (mediante RT-PCR) después de tres y seis horas de la perfusión. Los resultados obtenidos al cambiar *bcl-2-AS* por el antisentido control no fueron significativamente diferentes de los obtenidos en los controles o en presencia sólo de VRP. Los datos se muestran como media \pm desviación típica para seis experimentos independientes. Se utilizó para comparar los distintos tratamientos y los tiempos de medición una ANOVA de dos factores comparando entre los distintos tiempos y las condiciones. Las letras indican entre ellas diferencias significativas ($p < 0,05$).

5. La inhibición de la actividad γ -GT previene el aumento de GSH en células tratadas con el oligonucleótido antisentido anti-*bcl-2* y VRP.

La cisteína actúa como aminoácido limitante en la síntesis de GSH y el crecimiento celular (Hanigan, 1995; Obrador y cols., 2002). Por ello las células malignas para poder aumentar la tasa de síntesis de GSH, necesitan asegurarse la biodisponibilidad de cisteína. La enzima γ -GT provee en última instancia de la cisteína que necesita la célula tumoral degradando el GSH extracelular (*in vivo*, fundamentalmente el GSH plasmático) (ver introducción, apartado 2.1). Con lo cual, la expresión de γ -GT puede reportar a las células tumorales una ventaja.

Ya vimos que el contenido en GSH aumentaba al tratar las células con el antisentido y verapamil (tabla III), Este hecho podría deberse a que una disminución en el contenido celular de GSH, debida al aumento de su salida al espacio extracelular, podría causar una respuesta “rebote” por parte de la célula acelerando la síntesis de este tripéptido. Para ello la célula necesitaría tener disponible cisteína que pueda ser facilitada en parte por la γ -GT. Teniendo en cuenta estos hechos podríamos limitar la síntesis de GSH si conseguimos inhibir la actividad de esta enzima.

Con esta idea realizamos experimentos donde inhibíamos dicha enzima mediante la utilización de ACV, un inhibidor irreversible de la γ -GT (Ruoso y Hedley, 2004) que se une a esta enzima por los sitios de unión de los sustratos γ -glutamilo, compitiendo por ello con el GSH.

En el experimento se aplicaron varias condiciones: células tratadas con el antisentido y VRP; células tratadas sólo con ACV; células tratadas con antisentido, VRP y ACV; y por último, células no tratadas. La ACV fue añadida a la cámara de perfusión durante 30 minutos a una concentración de 1 μ M (carente de efectos no tóxicos *per se*).

Efectos de la inhibición de γ GT inducida por ACV sobre el contenido de GSH en células B16M-F10 tratadas con bcl-2-AS y VRP.

Adiciones	γ -GT (mU/10 ⁶ células)	GSH síntesis (nmol/10 ⁶ células x h)	salida GSH (nmol/10 ⁶ células x h)	GSH (nmol/10 ⁶ células)
Ninguna	33 \pm 6 ^a	1.1 \pm 0.2 ^c	1.4 \pm 0.2 ^b	26 \pm 4 ^b
bcl-2-AS +VRP	39 \pm 8 ^a	4.2 \pm 0.4 ^a	2.9 \pm 0.4 ^a	40 \pm 6 ^a
ACV	0 \pm 0	0.6 \pm 0.2 ^d	1.6 \pm 0.3 ^b	19 \pm 2 ^c
bcl-2-AS +VRP+ACV	0 \pm 0	1.9 \pm 0.3 ^b	3.1 \pm 0.5 ^a	12 \pm 3 ^d

Tabla VI. Las células se cultivaron y perfundieron como se indica en la tabla III. Tanto la concentración de VRP como la de ACV fueron de 1 μ M. Tanto el contenido en GSH como la actividad γ -GT se midieron tras doce horas del inicio de la perfusión. Las síntesis y la liberación de GSH se comenzaron a medir a las 12 horas de perfusión, usando una mezcla completa de aminoácidos precursores. Los datos se muestran como media \pm desviación típica para seis experimentos independientes. Para comparar los distintos tratamientos y los tiempos de medición se utilizó una ANOVA de un factor. Las letras indican entre ellas dentro de cada columna, diferencias significativas ($p < 0,01$).

Podemos observar como la ACV disminuye la actividad γ -GT y la síntesis de GSH sin afectar la salida de éste (tabla VI).

Como habíamos visto antes, la velocidad de síntesis aumenta con bcl-2-AS y VRP, sin embargo, no existen diferencias significativas si estos tratamientos se combinan con ACV.

Con esta combinación de tratamientos se logra en células malignas B16M-F10 un aumento en la tasa de liberación de GSH de hasta dos veces los niveles control (debido a la acción combinada de *bcl-2*-AS y VRP); y una disminución de la síntesis de GSH, debida a la disminución en la disponibilidad de Cys. El conjunto de resultados nos sugiere una posible terapia de depleción selectiva de GSH en células de melanoma B16-F10.

6. Sensibilización de las células B16M-F10 a la citotoxicidad tumoral inducida por el endotelio vascular.

Resultados previos demostraron que la sensibilidad a la citotoxicidad generada por el endotelio vascular aumenta en células metastáticas con bajo contenido en GSH (pretratadas *in vitro* con BSO) (Anasagasti y cols., 1998). Tras el estudio de los mecanismos de depleción de GSH, se estudió si la combinación de *bcl-2*-AS, VRP y ACV podría ser tan efectiva como BSO pero de forma selectiva.

En primer lugar, se ensayaron, de forma paralela, el efecto de BSO y la combinación de *bcl-2*-AS +VRP+ACV durante la interacción *in vitro* entre las células metastáticas y el HSE.

Tanto el BSO como la combinación de *bcl-2*-AS+VRP+ACV disminuyeron el contenido en GSH a niveles que se correspondían con un 35%-40% de los valores control. Sin embargo, la muerte celular inducida por el endotelio vascular fue mucho mayor en el tratamiento con *bcl-2*-AS+VRP+ACV (aproximadamente un 96%) (Ver tabla VII). Estos resultados concuerdan con los encontrados en trabajos previos donde la depleción de GSH y Bcl-2 inhibe la supervivencia de B16M-F10 durante la interacción con el endotelio vascular (Ortega y cols., 2003a). También se observa en estos resultados que la depleción de GSH no alteró el porcentaje celular de adhesión al HSE (tabla VII).

Efecto de la depleción de GSH inducida por *bcl-2-AS*, VRP, y ACV en la interacción in vitro entre células de B16M-F10 y el endotelio vascular.

Pretratamiento de células B16M-F10 ...	GSH de B16M-F10 (nmol/10 ⁶ células) antes del cocultivo con células HSE		células Tumorales			
	- GSH éster	+ GSH éster	Adhesión (%)		Citotoxicidad (%)	
			- GSH éster	+ GSH éster	- GSH éster	+ GSH éster
Control	35 ± 4 ^b	48 ± 5 ^a	55 ± 7 ^a	51 ± 4 ^a	16 ± 4 ^d	15 ± 3 ^d
BSO	14 ± 2 ^c	45 ± 4 ^a	50 ± 5 ^a	53 ± 8 ^a	66 ± 11 ^b	20 ± 6 ^d
<i>bcl-2-AS</i> + VRP + ACV	12 ± 3 ^c	44 ± 4 ^a	52 ± 7 ^a	54 ± 6 ^a	96 ± 3 ^a	40 ± 4 ^c

Tabla VII. Las células B16M-F10 fueron cultivadas previamente durante tres días en ausencia o presencia de *bcl-2-AS* (50µM). Pasado ese tiempo se sembraron en ausencia de los oligos (24horas). Se cocultivaron las B16M-F10 con células HSE precultivadas durante veinticuatro horas. Veinte minutos antes de la adición de las células tumorales a las HSE, se lavaron las placas (ver material y métodos). Cuando las células tumorales estaban adheridas al HSE se añadieron TNF-α (100 unidades/ml) e IFN-γ (50 unidades/ml) para que actuaran como potentes activadores de la generación de NO y H₂O₂ por parte del HSE (Carretero y cols., 2001).

En los ensayos de citotoxicidad, se determinó, tras 6 horas de incubación, la citotoxicidad tumoral (expresada como el % de células tumorales que pierden su viabilidad entre las 4-6 horas de incubación). Durante las 6 horas, la viabilidad de las células de HSE fue de un 98%. Cuando se añadió el TNF-α o el IFN-γ a cultivos de células tumorales solamente, no se observaron efectos citostáticos o citotóxicos dentro del periodo de las 6 horas.

En los casos donde se indica, se incubaron las células tumorales durante 24 horas con GSH éster (1mM), BSO (0,2 mM), VRP (1µM) o ACV (1µM) antes del cocultivo con HSE.

El pretratamiento de las células tumorales únicamente con *bcl-2*-AS, incrementó la citotoxicidad en un 36%, tanto en presencia como en ausencia de GSH éster. Y el pretratamiento con VRP o ACV no afectó significativamente el % de citotoxicidad en el tumor.

Los datos se muestran como media \pm desviación típica para cinco experimentos independientes. Para comparar los distintos tratamientos y los tiempos de medición se utilizó una ANOVA de dos factores comparando las condiciones y, dentro de cada variable, la ausencia o presencia de GSH éster. Las letras indican entre ellas diferencias significativas ($p < 0,01$).

Para probar que el GSH estaba involucrado directamente en la regulación de la supervivencia de células metastáticas, se añadió GSH éster (que revierte la depleción de GSH hasta alcanzar valores normales) (tabla VII). El GSH éster previno la citotoxicidad inducida por el endotelio vascular en presencia de BSO, pero sólo parcialmente en presencia de *bcl-2*-AS, VRP y ACV (razonable teniendo en cuenta que en este caso la depleción sobre Bcl-2 continúa).

Tras el estudio *in vitro* de los efectos del endotelio vascular, se pasó a estudiar *in vivo* la adhesión y viabilidad de B16M-F10 en la microvasculatura hepática. Mediante la utilización de células B16M-F10 marcadas con calceína, que presentan un citoplasma verde fluorescente, se siguió, con el uso de microscopía, la unión de estas células al HSE tras una inoculación intraportal (ver material y métodos)(figura3).

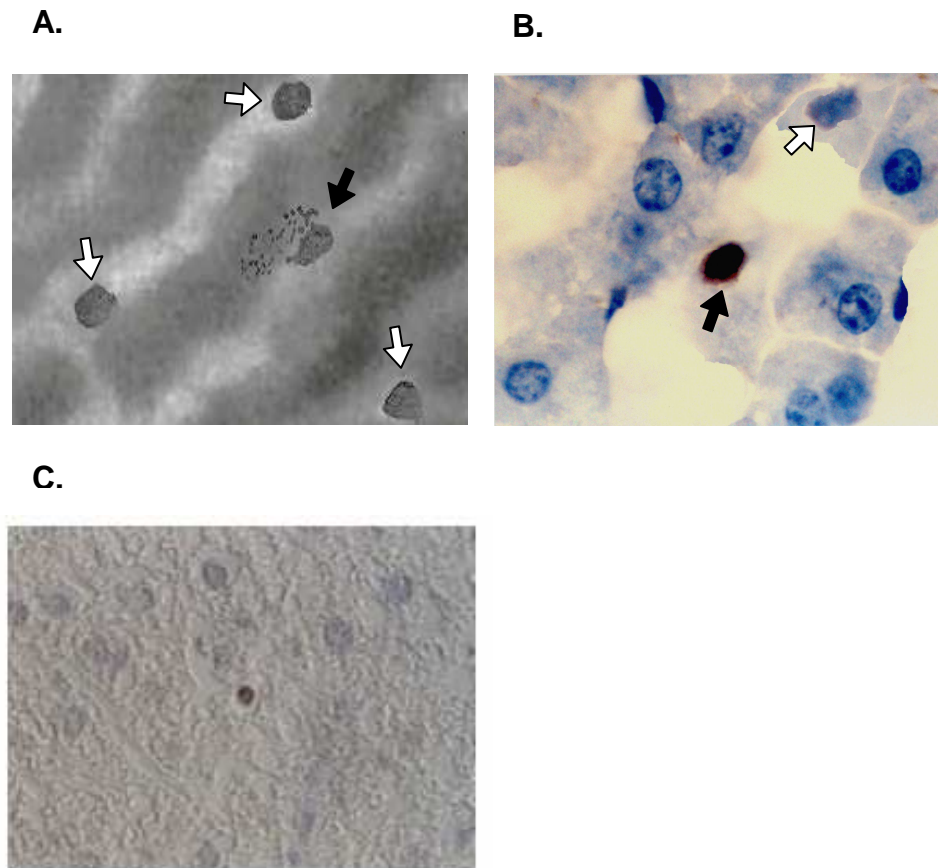


Figura 3. Fotos de las células B16M-F10 en el HSE. A) Foto intravital de células B16M-F10 intactas (flecha blanca) y dañadas (flecha negra) durante su interacción con el endotelio sinusoidal hepático (3 horas tras la inoculación intraportal). B) Técnica TUNEL mostrando células B16M-F10 con núcleo intacto (flecha blanca) y apoptótico (flecha negra) dentro de los sinusoides hepáticos. Se observa el marcaje con diaminobenzidina (DAB) contrastado con tinción de hematoxilina, utilizando un objetivo x63. C) Se prepararon en paralelo preparaciones con S-100 como marcaje control de células tumorales melanocíticas dentro del parénquima hepático (foto captada a x40).

Tras la inoculación intraportal de las células B16M-F10 control y pretratadas con *bcl-2-AS*, no se observaron diferencias en cuanto a la retención en la microvascularización hepática se refiere (Tabla VIII). Además, las células no tratadas con *bcl-2-AS*, tanto en el caso donde se

trató a los ratones con solución salina como con VRP y ACV, se encontraban intactas. En el caso de células pretratadas con *bcl-2*-AS, la viabilidad disminuyó notablemente hasta el punto en que el tratamiento con LPS disminuyó la viabilidad de un 80% a un 10%.

Efecto del tratamiento in vivo con bcl-2-AS, VRP, y ACV sobre la retención y viabilidad de las células de B16M-F10 dentro de la microvasculatura hepática.

tratamiento <i>In vivo</i> ...		Número de células retenidas (número medio por lóbulo)				Células intactas (% de las células retenidas)			
		Solución salina		LPS		Solución salina		LPS	
		- <i>bcl-2</i> - AS	+ <i>bcl-2</i> - AS	- <i>bcl-2</i> - AS	+ <i>bcl-2</i> - AS	- <i>bcl-2</i> - AS	+ <i>bcl-2</i> - AS	- <i>bcl-2</i> - AS	+ <i>bcl-2</i> - AS
Solución salina	B16M-F10...	46 ± 5	48 ± 3	38 ± 4	37 ± 6 ⁺	95 ± 4	70 ± 5**	80 ± 6 ⁺⁺	54 ± 5*** ⁺⁺
VRP + ACV		43 ± 6	47 ± 7	35 ± 3	40 ± 7	98 ± 2	45 ± 7**	85 ± 8 ⁺⁺	10 ± 4*** ⁺⁺

Tabla VIII. El número de células tumorales retenidas se calculó a los 60 minutos de la inyección. El número de células intactas se calculó a las 6 horas de la inyección. Los ratones tratados con LPS recibieron una sola dosis intravenosa de 0,5mg/Kg., 6 horas antes de la inoculación de las células tumorales (Ortega y cols., 2003a). La administración intravenosa de VRP y ACV empezó 30 minutos antes de la inoculación de las células tumorales. Antes de dicha inoculación, las células tumorales fueron tratadas con o sin *bcl-2*-AS (50 μM), tal y como se indica en la tabla III. El contenido en GSH tanto en los controles (tratadas con suero fisiológico) como en los tratados con el antisentido, antes de la inoculación, era similar al descrito en la tabla III. Los resultados encontrados en presencia de un oligonucleótido *mismatch* no mostraron diferencias significativas con respecto a los valores encontrados en ausencia del antisentido.

Resultados

Los datos se muestran como media \pm desviación típica para cuatro experimentos independientes. Se realizó un test de Student para comparar la ausencia o presencia de *bcl-2*-AS (**, $p < 0,01$) y también la diferencia entre los ratones tratados con LPS y los que no (+, $p < 0,05$; ++, $p < 0,01$).

Para finalizar con este estudio, se realizaron otros experimentos donde se midieron los niveles de GSH en diversos tejidos (cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñones, páncreas, músculo esquelético, testículos y eritrocitos), tanto de ratones no tratados y sin tumor como de los ratones tratados con LPS, VRP y ACV (a los que se les inocularon las células B16M-F10 pretratadas con el antisentido). Se observó que no existían diferencias significativas comparando los resultados previos de ratones sin tumor o portadores de células B16M-F10. Por lo que pudimos concluir que no se afectaba con dicho tratamiento a los niveles de GSH de los tejidos normales, es decir que se trataba de una estrategia selectiva.

Todos estos resultados indican que tanto la depleción selectiva de GSH como la de Bcl-2 se pueden utilizar para sensibilizar a las células metastáticas de melanoma a la citotoxicidad generada por el endotelio *in vivo*.

Gran parte de la importancia del GSH celular radica en su capacidad para reducir especies químicas reactivas potencialmente dañinas. En la mitocondria, aproximadamente el 1-2% del oxígeno que entra en la cadena de electrones no es reducido por la citocromo oxidasa, lo cual representa una fuente muy importante de radicales libres. De hecho, se ha demostrado que el mtGSH es un factor crítico para la supervivencia de las células B16M (Ortega y cols., 2003b). La disminución de los niveles de mtGSH aumentaba la muerte celular inducida por TNF- α y este efecto se veía potenciado si se le sumaba un tratamiento con *bcl-2*-AS. De forma que

la terapia de depleción selectiva de GSH y Bcl-2, puede potenciarse al combinarla con dosis no tóxicas de TNF- α o con una dieta enriquecida en glutamina que facilita el mecanismo de inhibición del transporte de GSH a la mitocondria mediado por L-Glu (ver apartado 5.1.3. de “Introducción”).

7. Obtención de células tumorales adaptadas a la glutamina.

Se estudió primero el crecimiento tumoral, la ingesta de alimento, los niveles sanguíneos y niveles en músculo esquelético de L-Gln (ver apartado 5.1.3. de Introducción) de ratones con células B16M-F10 inoculadas en la pata (crecimiento localizado); después se estudió los cambios metabólicos que experimentan dichas células *in vivo*, al alimentar al portador con una dieta enriquecida en glutamina.; todos estos estudios se llevaron a cabo en las tres condiciones siguientes: en ratones portadores del tumor alimentados con GED, en ratones portadores alimentados con SD y en ratones control sin tumor alimentados con SD (Tabla IX).

La **ingesta de comida** por parte de los ratones portadores del tumor disminuyó, durante los 24 días de experimentación, con respecto a los ratones control (un 40% menos en el caso de los ratones alimentados con SD y un 21% menos en el caso de los ratones alimentados con GED). Una consecuencia de ello es la **disminución de peso** que sufrieron los animales con células tumorales inoculadas (~21% en el caso de los alimentados con SD y ~ 7% en el de los que estaban con GED). Resultados que indican que con la dieta GED conseguimos limitar el descenso en el peso que sufren los animales con células tumorales inoculadas.

Resultados

Crecimiento tumoral, niveles plasmáticos y salida del músculo esquelético de L-glutamina en ratones portadores de células B16M-F10 alimentados con SD o GED.

Alimentación...	Ratones sin tumor			Ratones inoculados con células B16M-F10					
	SD			SD			GED		
Días tras la inoculación tumoral...	0	12	24	0	12	24	0	12	24
Consumo de alimento (g/Kg. peso corporal x día)	108± 9	104± 5	113± 7	106± 9	87± 8 ^a	65± 6 ^a	105± 7	96± 8	83± 5 ^a
Diámetro tumoral (mm)	–	–	–	0.0	3.1 ± 0.4	9.2 ± 0.6	0.0	3.5 ± 0.3	9.0 ± 0.5
Peso corporal menos peso tumoral (g)	22.8± 0.5	23.3± 0.9	24.0± 0.7	23.0± 0.4	21.3± 1.0 ^b	18.2± 0.8 ^a	22.4± 0.3	21.5± 0.9	20.9± 1.0 ^{ac}
Niveles en plasma de Gln (nmol/ml)	472± 39	465± 45	488± 53	459± 28	412± 31	335± 27 ^a	478± 50	460± 42	470± 30 ^c
Salida de Gln del músculo esquelético (mmol/100g peso corporal x min)	156± 25	172± 30	170± 19	163± 27	380± 40 ^a	325± 45 ^a	175± 20	215± 26 ^c	206± 33 ^c

Tabla IX. Los datos se muestran como media ± desviación típica para grupos de 10 animales (un grupo por cada punto de tiempo). Para el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student. ^a*p*< 0.01 y ^b*p*< 0.05 comparando a los ratones portadores de tumor y alimentados con SD o GED frente a los ratones control sin tumor; y ^c*p*< 0.01 comparando a los ratones portadores alimentados con SD frente a portadores alimentados con GED.

Los **niveles plasmáticos de glutamina** disminuyeron en los ratones portadores del tumor alimentados con SD, pero se mantuvieron los valores control (ratones no portadores del tumor) en los ratones con tumor alimentados con GED.

Al medir la **liberación de L-Gln** del músculo esquelético, se vio que se duplicaba con respecto a los valores control en el caso de los ratones portadores alimentados con SD mientras que el aumento era inferior en el caso de los alimentados con GED (tabla IX).

Posteriormente, se investigaron las posibles adaptaciones en el metabolismo de L-Gln de las células tumorales inoculadas en ratones alimentados con GED.

Tras 24 días de alimentación de los ratones con SD o con GED, las células tumorales aisladas presentaban un patrón de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de la Gln diferente (tabla X). Se puede observar como en las células tumorales de los ratones alimentados con GED se activan las rutas catabólicas para la glutamina y se inhiben las anabólicas. También se determinaron varios metabolitos que intervienen en el metabolismo de la L-Gln, como el L-Glu citosólico (inhibidor potencial de la entrada de GSH a la mitocondria), viendo un aumento de este metabolito: 1,7mM en las células aisladas de ratones con SD y 3,4 mM en las aisladas de ratones alimentados con GED. Este aumento podría inducir una disminución en la cantidad de GSH mitocondrial en las células B16M-F10 adaptadas a GED (a partir de este momento, denominadas B16M-F10-Gln⁺).

Adaptaciones inducidas por la GED en el metabolismo de L-glutamina en células B16M-F10.

Actividades enzimáticas (mU/10 ⁶ cells)	Alimentación...	
	SD	GED
Glnasa	92.1 ± 16.4	190.5 ± 30.6 ^a
Glns	23.6 ± 2.1	7.9 ± 1.5 ^a
Gludh	18.1 ± 2.7	24.4 ± 3.0 ^b
Alat	8.7 ± 1.2	15.7 ± 2.5 ^a
Aspt	50.4 ± 7.4	71.6 ± 6.5 ^a
Metabolitos (nmol/10⁶ cells)		
L-Gln	n.d.	n.d.
L-Glu citosólico	13.6 ± 2.1	27.6 ± 4.0 ^a
L-Glu mitocondrial	2.3 ± 0.6	4.3 ± 0.8 ^a

Tabla X. El aislamiento de las células B16M-F10 se llevó a cabo 24 días después de la inoculación. Los resultados se muestran como media ± desviación típica para 8 determinaciones diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó una *t* de Student. ^a*p*< 0,01, ^b*p*<0,05 comparando ratones portadores de B16M-F10 alimentados con GED y portadores alimentados con SD. n.d.: niveles no detectables.

8. L-Gln induce cambios en el *estatus* del mtGSH de las células B16M-F10.

No se encontraron diferencias significativas entre el contenido de GSH citosólico (citGSH) de células B16M-F10 y B16M-F10-Gln⁺; mientras que se observó una **disminución significativa de los niveles de mtGSH** en células B16M-F10-Gln⁺ con respecto al de las células B16M-F10 (tabla XI). Para comprobar que el citGSH no estaba afectado por la GED, se realizaron medidas de las actividades enzimáticas γ -GCS y GSH sintetasa, viendo que eran similares en los dos tipos celulares.

Contenidos de GSH y GSSG citosólicos y mitocondriales en células B16M-F10 aisladas de ratones alimentados con SD o GED.

Alimentación	GSH (nmol/10 ⁶ células)		GSSG (nmol/10 ⁶ células)	
	citosólico	mitocondrial	citosólico	mitocondrial
SD	23 ± 4	7.1 ± 1.5	1.2 ± 0.3	0.5 ± 0.2
GED	26 ± 5	3.4 ± 0.9 ^a	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.2

Tabla XI. Los datos se muestran como medias ± desviación típica para 8 determinaciones diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó una *t* de Student. ^ap>0,01, diferencia significativa respecto al grupo SD.

Se estudió seguidamente el transporte de GSH al interior de las mitocondrias aisladas de células B16M-F10 y B16M-F10-Gln⁺. Al añadir L-Glu, a la concentración citosólica hallada en células B16M-F10-Gln⁺, se observó una inhibición del transporte mitocondrial de GSH (figura 4).

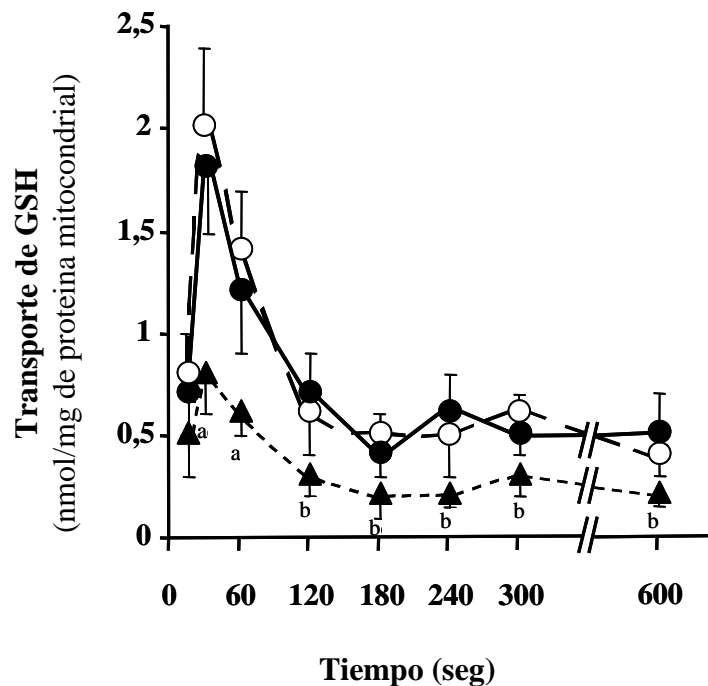
Inhibición del transporte de mtGSH por L-Glu

Figura 4. El aislamiento de las mitocondrias tanto de B16M-F10 como de B16M-F10-Gln⁺ se realizó tras 24 días de la inoculación. Las incubaciones se realizaron en presencia de GSH (6 mM, concentración aproximada de citGSH encontrada tanto en células B16M-F10 como en B16M-F10-Gln⁺) y 1 mM de ATP (que asegura la función del sistema de transporte dependiente de ATP del mtGSH) (Martensson y cols., 1990). Los datos de la figura corresponden a mitocondrias de células B16M-F10-Gln⁺. Los datos se muestran como medias \pm desviación típica para 8 determinaciones diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó una *t* de Student. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$ para las comparaciones entre el consumo en ausencia de L-Glu(O) y los obtenidos en presencia de 1,7 (●) o 3,4 mM (▲) que corresponden con las concentraciones citosólicas de L-Glu encontradas en las células B16M-F10 aisladas de ratones con SD o con GED.

9. Citotoxicidad generada por TNF- α y *bcl-2*-AS en células B16M-F10-Gln⁺.

El TNF- α interfiere con el flujo de electrones en la mitocondria (Lancaster y cols., 1989) y aumenta la producción de ROS (Goossens y cols., 1996). En las células B16M-F10, el TNF- α recombinante murino (rmTNF- α) induce depleción de mtGSH, pero no a niveles suficientemente bajos como para conseguir la apertura del PTPC (Ortega y cols., 2003b). *In vitro*, se puede inducir la depleción selectiva de mtGSH en células B16M-F10 mediante la incubación de éstas en presencia de BSO y monoclorobimano (un sustrato de la GSH transferasa). Bajo estas condiciones se ha visto en estudios previos, que el rmTNF- α activa la apoptosis en células B16M-F10 una vez los niveles de mtGSH han descendido por debajo del 30% de los valores controles (Ortega y cols., 2003a).

Pero esta depleción inducida por el BSO y el monoclorobimano no es específica de células tumorales, por lo que no es aplicable *in vivo*. Sin embargo, alimentar a los ratones con una GED puede inducir depleción tumoral del mtGSH (tabla XI) sin que se vea afectado el GSH de los tejidos normales (Carretero y cols., 2000). De este modo la GED se puede utilizar como una medida, clínicamente aceptable, para potenciar la citotoxicidad inducida por el rmTNF- α en células con alto poder metastático.

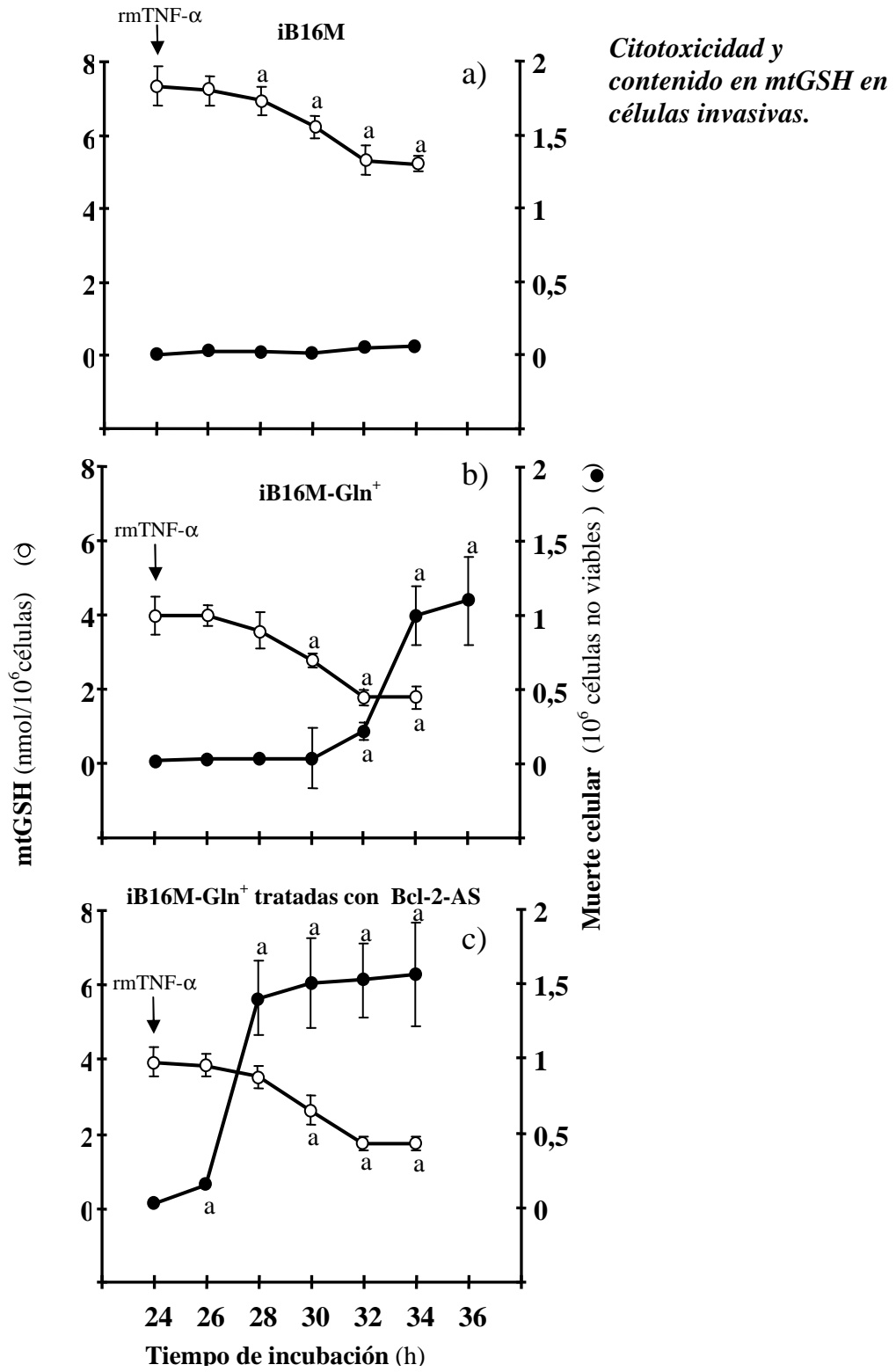


Figura 5. El rmTNF- α (50U/ml) se añadió al medio de cultivo a las 24 horas postsiembra. Las células iB16M-Gln⁺ se pretrataron con los oligonucleótidos como se indica en el apartado “material y métodos”. La proteína Bcl-2 fue cuantificada en la fracción citosólica soluble de las células tumorales (ver “material y métodos”) (Eissa y Seada, 1998). Los niveles de Bcl-2 en células iB16M, iB16M-Gln⁺ e iB16M-Gln⁺ tratadas con *bcl-2-AS* fueron respectivamente, 31.4 \pm 2.6, 34.7 \pm 3 y <3 unidades/mg de proteína (para n= 5 determinaciones distintas). En las poblaciones de células no viables, a 34 horas postsiembra, el porcentaje de células apoptóticas fue mayor del 80%. Los datos se muestran como media \pm desviación típica de 6 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student. ^ap<0.01 comparando los datos con los controles (células a 24 horas).

Una sobreexpresión de Bcl-2 previene la liberación de señales moleculares proapoptóticas asociada a un incremento de la permeabilidad en la membrana mitocondrial, pero sólo cuando los niveles de mtGSH se mantienen por encima del 30% de los valores control (Ortega y cols., 2003a). Este límite aumentaba a valores del 60% respecto al control en células B16M-F10 tratadas con *bcl-2-AS* (Ortega y cols., 2003a). Por ello, una combinación de GED, TNF- α y *bcl-2-AS* podría teóricamente disminuir la supervivencia de células B16M con alto poder metastático. Para probar esta hipótesis, se inocularon vía portal células B16M-F10 y células B16M-F10-Gln⁺ que, tras 10 días, produjeron macroscópicamente metástasis hepáticas. De estos focos hepáticos se aislaron células iB16M-Gln⁺ (células B16M-F10-Gln⁺ invasivas), y se cultivaron para estudiar *in vitro* los efectos de la adición de rmTNF- α y *bcl-2-AS*.

A las 10 horas de añadir rmTNF- α , el mtGSH de las células iB16M disminuyó hasta un 71% de los valores control, pero sin afectar significativamente a la viabilidad celular (Figura 5a). En el caso de células iB16M-Gln⁺, en presencia de rmTNF- α , el contenido en mtGSH llegó a

alcanzar niveles que correspondían tan sólo con un 32% de los equivalentes en células iB16M. Y en este mismo caso, la viabilidad disminuyó un 62% con respecto a los valores control (Figura 5b). En el caso de células iB16M-Gln⁺ tratadas con *bcl-2-AS*, a las 10 horas de añadir el rmTNF- α (los niveles de mtGSH eran similares a los de la situación anterior), la viabilidad disminuía un 88% con respecto al control, y la muerte celular aumentó más temprano (sobre las dos horas postadición del rmTNF- α) (figura 5c). Claramente, el *bcl-2-AS*, en células metastáticas adaptadas a la Gln, facilita la citotoxicidad inducida por TNF- α aun cuando los niveles de mtGSH están por encima del límite crítico previamente estudiado (el 30% de los valores control).

La depleción de mtGSH puede causar un fallo en el potencial de membrana mitocondrial y facilitar la apertura del PTPC, liberando con ello señales moleculares proapoptóticas. Por ello se testó si el tratamiento con *bcl-2-AS* y TNF- α activaba el mecanismo molecular de la muerte celular en las células iB16M-Gln⁺. El rmTNF- α indujo la generación de ROS asociada con la depleción de ATP y de mtGSH, una disminución del potencial de membrana mitocondrial, y un incremento de los niveles de citocromo c citosólico y de la actividad de la caspasa 3 (tabla XII). En dicha tabla se evidencia cómo el nivel del potencial de membrana mitocondrial era mucho menor en las células tratadas con *bcl-2-AS* y TNF- α que en las células tratadas sólo con la citokina. Los niveles de citocromo c y caspasa 3 fueron mayores en células tratadas con *bcl-2-AS* y rmTNF- α que en las tratadas sólo con la citokina (tabla XII). Por último, para comprobar que el mtGSH estaba directamente implicado en este mecanismo, se añadió GSH éster que atraviesa la membrana plasmática, se desacetila y repleciona rápidamente los niveles del tripéptido. El GSH éster

facilitó también el aumento del mtGSH y previno la activación molecular de la muerte celular en células tratadas con *bcl-2-AS* y TNF- α (tabla XII).

Activación molecular de la apoptosis y generación de ROS en *iB16M-Gln⁺* e *iB16M-Gln⁺* tratadas con *bcl-2-AS*.

Parámetros	<i>iB16M-Gln⁺</i>			<i>iB16M-Gln⁺</i> tratadas con <i>bcl-2-AS</i>		
	Controles no tratados	+rmTNF- α	+rmTNF- α +GSH éster	Controles no tratados	+rmTNF- α	+rmTNF- α +GSH éster
H₂O₂ (nmol/10 ⁶ céls x min)	0.53± 0.14	2.10±0.36 ^a	0.79±0.17	0.60±0.15	2.34±0.44 ^a	1.10±0.20 ^b
O₂⁻ (Δ FL1)	2.35± 0.47	4.64±0.52 ^a	2.77±0.36	2.57±0.36	4.45±0.61 ^a	3.40±0.34 ^{ad}
mtGSH (nmol/10 ⁶ céls)	3.5± 0.7	1.5±0.4 ^a	6.9±1.1 ^a	3.3±0.5	1.5±0.3 ^a	4.2±0.8 ^c
MMP (% , ratio de acumulación de TPM)	90± 7	55±8 ^a	98± 2	70±9 ^c	30±6 ^{ac}	75±12 ^c
mtATP (mM)	1.02± 0.30	0.60±0.21	1.07±0.23	0.75±0.16	0.41±0.12 ^b	0.63±0.15 ^d
Cit. c citosólico (% de control)	100± 15	180± 26 ^a	120±19	157±20 ^c	210±35 ^b	150±24
Caspasa 3 (pmol/10 ⁶ céls x min)	1.45± 0.25	3.43±0.60 ^a	1.82±0.17 ^b	2.06±0.39 ^d	3.91±0.78 ^a	2.86±0.30 ^{ac}

Tabla XII. *bcl-2-AS* y rmTNF- α se añadieron al medio de cultivo como se indica en la figura 5. GSH éster (0.5 mM) se añadió dos horas antes de la adición de la citokina. Se tomaron las diferentes medidas después de 8 horas de la adición de la citokina en el caso de células *iB16M-Gln⁺*; y dos horas tras la adición de la citokina en el caso de *iB16M-Gln⁺* tratadas con *bcl-2-AS*. Los datos se muestran como media \pm desviación típica de 6 experimentos diferentes. ^ap<0.01 y ^bp<0.05 comparando todas las condiciones de cada tipo celular con los controles no tratados; Para el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student. ^cp<0.01 y ^dp<0.05 comparando todas las condiciones de las células *iB16M-Gln⁺* con *iB16M-Gln⁺* tratadas con *bcl-2-AS*. El grupo *a,d* comprende los resultados que cumplen la diferencia significativa estadística tanto de *a* como de *d* y el grupo *a,c* cumplen la diferencia significativa tanto de *a* como de *c*.

10. Las células B16M-F10-Gln⁺ tratadas con *bcl-2-AS* y resistentes al estrés oxidativo/nitrosativo, tienen mayor actividad de enzimas antioxidantes.

Los mecanismos de muerte celular activados en iB16M-Gln⁺ tratadas con *bcl-2-AS* y rmTNF- α , disminuyeron el número y viabilidad celular a un 34% y 85% respectivamente con respecto a los valores control. El aumento en la producción de ROS inducido por TNF- α , junto con el tratamiento con *bcl-2-AS*, afectó a las actividades de las principales enzimas antioxidantes. Como se observa en la tabla XIII, comparando con células no tratadas o células tratadas con *bcl-2-AS* donde no se vio afectado el sistema enzimático, la combinación de *bcl-2-AS* y rmTNF- α indujo aproximadamente 5 veces más actividad de Mn-SOD y dos veces más actividad de CAT .

Huang y cols.(2000) sugirieron que la supervivencia de las células malignas podía ser dependiente de los niveles de SOD; de hecho, llegaron a proponer a la enzima como una posible diana para la eliminación selectiva de células tumorales.

Actividades antioxidantes en células iB16M-Gln⁺ e iB16M-Gln⁺ tratadas con bcl-2-AS, y células iB16M-Gln⁺ tratadas con bcl-2-AS y rmTNF- α

Enzima	Células iB16M		
	iB16M-Gln ⁺	iB16M-Gln ⁺ tratadas con bcl-2-AS	iB16M-Gln ⁺ tratadas con bcl-2-AS y rmTNF- α
CuZn-SOD (U/10 ⁶ células)	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.3
Mn-SOD (U/10 ⁶ células)	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.2 ^{ab}
CAT (mU/10 ⁶ células)	4.1 ± 0.6	4.5 ± 0.5	9.6 ± 1.0 ^{ab}
GPx (mU/10 ⁶ células)	7.5 ± 1.3	7.8 ± 1.5	8.1 ± 1.1
GR (mU/10 ⁶ células)	10.6 ± 1.7	9.7 ± 1.9	11.2 ± 2.3
G6PDH (mU/10 ⁶ células)	27.4 ± 5.2	30.2 ± 7.4	29.5 ± 5.6

Tabla XIII. Las actividades antioxidantes se midieron en células iB16M-Gln⁺ viables. Dichas células fueron tratadas con bcl-2-AS o bcl-2-AS y rmTNF- α y las células viables supervivientes se cultivaron de nuevo durante 60 horas antes de determinar las actividades enzimáticas. Las actividades CuZn-SOD y Mn-SOD se expresan como unidades /10⁶ células; CAT, GPx, GR y G6PDH como mU/10⁶ células. Los datos se muestran como media ± desviación típica para 4 determinaciones diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student. ^ap<0.01 comparando bcl-2-AS o bcl-2-AS + rmTNF- α con iB16M-Gln⁺; ^bp<0.01 comparando bcl-2-AS + rmTNF- α con células tratadas sólo con bcl-2-AS.

Teniendo en cuenta los resultados descritos en la tabla XIII y en sugerencias como las de Huang, se investigó la posibilidad de combinar dos oligonucleótidos antisentido (bcl-2-AS y SOD2-AS) para prevenir la resistencia de las células tumorales invasivas al estrés oxidativo/nitrosativo

inducido por el rmTNF- α . La combinación de los dos oligonucleótidos aumentó la citotoxicidad del rmTNF- α [el número de células disminuyó a un 3% del valor control (células iB16M-Gln⁺ no tratadas) y la viabilidad a un 31%]. Esta estrategia experimental es, por lo tanto, capaz de disminuir el número de células malignas viables aproximadamente a un 1% de los valores control (tabla XIV). La actividad de Mn-SOD en células tratadas con el antisentido anti-*SOD* fue prácticamente nula. La expresión de Mn-SOD, analizada por RT-PCR, fue de $1,2 \pm 0,2$, en controles y $0,02 \pm 0,01$ en células tratadas con *SOD2-AS* (para una $n=4$, $p < 0.01$).

La modificación de las actividades enzimáticas de Mn-SOD y CAT (tabla XIV), afectó a la producción de H₂O₂ y O₂^{•-}. La generación de H₂O₂ en el tratamiento con los dos antisentidos y en el tratamiento con rmTNF- α más los dos antisentidos, fue de 0.30 ± 0.08 y 0.26 ± 0.06 nmol/10⁶ células x min ($n=4$), que representan en ambos casos una disminución del 50% con respecto a los valores hallados en células no tratadas, y un 10% del valor obtenido en células tratadas con rmTNF- α (ver tabla XII).

La generación de O₂^{•-} en el caso de células tratadas con ambos antisentidos, solos o en combinación con rmTNF- α , fue de 3.17 ± 0.38 y 9.42 ± 0.86 (FL1) ($n=4$) respectivamente, con lo que en el segundo caso es dos veces superior a los valores encontrados cuando se tratan a las células con *bcl-2-AS* y rmTNF- α (tabla XII). Estos niveles elevados, encontrados al tratar con el *SOD2-AS*, deben ser responsables del gran número de muertes celulares encontrado en las células tratadas con los dos antisentidos y rmTNF- α (tabla XIV).

**Efectos de SOD2-AS sobre la citotoxicidad generada por
rmTNF- α en células tratadas con bcl-2-AS.**

Parámetros	iB16M-Gln ⁺					
	No tratadas con antisentido		+ bcl-2-AS		+ bcl-2-AS + SOD2-AS	
	-	+rmTNF- α	-	+rmTNF- α	-	+rmTNF- α
Nº celular (10 ⁶ cells)	2.25 ± 0.34	1.46 ± 0.20	2.08 ± 0.27	0.87 ± 0.16 ^a	1.92 ± 0.25	0.08 ± 0.04 ^{ac}
Viabilidad celular (%)	98.2 ± 1.3	82.0 ± 4.7	97.5 ± 1.0	75.0 ± 6.5	90.4 ± 3.7 ^{bd}	31.0 ± 4.8 ^{ac}

Tabla XIV. Se añadió rmTNF- α (50U/ml) al medio de cultivo a las 24 horas postsiembra. Las células iB16M-Gln⁺ se pretrataron con los oligonucleótidos, tal y como se indica en el apartado “material y métodos”. Los parámetros fueron medidos 12 horas después de la adición de la citokina. Los niveles de *Bcl-2* en los controles y en las células tratadas con *bcl-2-AS* fueron de 30-35 y <3 unidades/mg de proteína, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de *Bcl-2* al comparar condiciones *bcl-2-AS* y *bcl-2-AS + SOD2-AS*. La actividad Mn-SOD en los controles y en las células tratadas con *SOD2-AS* fue de 0.19± 0.04 y <0.01U/10⁶ células, respectivamente (n=5, $p < 0.01$). El tratamiento con *bcl-2-AS* no alteró significativamente la actividad de Mn-SOD. La actividad CAT en la condición control y en las células iB16M-Gln⁺ tratadas con *SOD2-AS* fue de 4.3±0.7 y 1.8±0.4 mU/10⁶ células respectivamente (n=5, $p < 0.01$). Los datos se muestran como media ± desviación típica de 6 experimentos diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student. ^{a,b} $p < 0.01$; ^{c,d} $p < 0.05$ (^a y ^c, comparando los tratamientos con *bcl-2-AS* o *bcl-2-AS + SOD2-AS* con células no tratadas con antisentido; ^b y ^d, comparando los tratamientos con *bcl-2-AS + SOD2-AS* con el tratamiento sólo con *bcl-2-AS*). *a, b* cumplen la diferencia significativa de *a* y *b* y *c, d* cumplen la diferencia significativa de *c* y *d*.

11. Eliminación de células invasivas supervivientes mediante quimioterapia.

Tras la aplicación de la estrategia experimental descrita en nuestro trabajo, resta un 1% de células invasivas (ver apartado anterior) altamente resistentes (a las que denominamos hr-iB16M-Gln⁺). Con la idea de lograr su eliminación, se estudió *in vitro* si la quimioterapia era efectiva (utilizando dosis de fármacos fácilmente extrapolables a condiciones *in vivo*).

Tras probar diferentes quimioterápicos de uso habitual contra células de melanomas murinos y humanos (vincristina, daunorrubicina, metotrexato, arsenato, cisplatina, carmustina, dacarbazina y taxol) (Garbe y Eigentler, 2007; Olszewska-Slonina y cols., 2004; Ugurel y cols., 2006; Zhang y cols., 2006), se seleccionó como más efectiva la combinación de taxol (20µM) y daunorrubicina (0,1µM). Las concentraciones utilizadas se encuentran dentro del rango de dosis clínicas aplicables a humanos (Kufe y cols., 2003). Al añadir la combinación de fármacos, se consiguió, *in vitro*, eliminar el 1 % de células hr-iB16M-Gln⁺.

La adición de taxol y daunorrubicina antes del tratamiento con los antisentidos y la citokina, disminuyó la viabilidad celular *in vitro* de B16M-F10 o iB16M-Gln⁺ a un 50 y un 90%, respectivamente, de los valores control. Cuando las células hr-iB16M-Gln⁺ se trataron con taxol o daunorrubicina, tras el tratamiento con antisentidos y citokina, se observó un descenso de la viabilidad celular hasta un a 0.10±0.03% o 0.15±0.04% (n=5, *p*<0.01), respectivamente, de los valores control. Se consiguió disminuir el número de células supervivientes a una cantidad ínfima; con lo que, teóricamente, se puede reproducir el tumor *in vivo*.

Al objeto de probar esta hipótesis, se inocularon 100 células viables hr-iB16M-Gln⁺ vía portal. Tras una semana, esa mínima cantidad de células dio lugar a microfocos metastáticos detectables; mientras que en el caso de células B16M-F10 (control) son necesarias más de 20000 células para obtener, tras una semana, metástasis similares detectables. Estos hallazgos sugieren que las células hr-iB16M-Gln⁺ tienen una agresividad extrema comparada con sus equivalentes en células control B16M -F10 (figura 6).

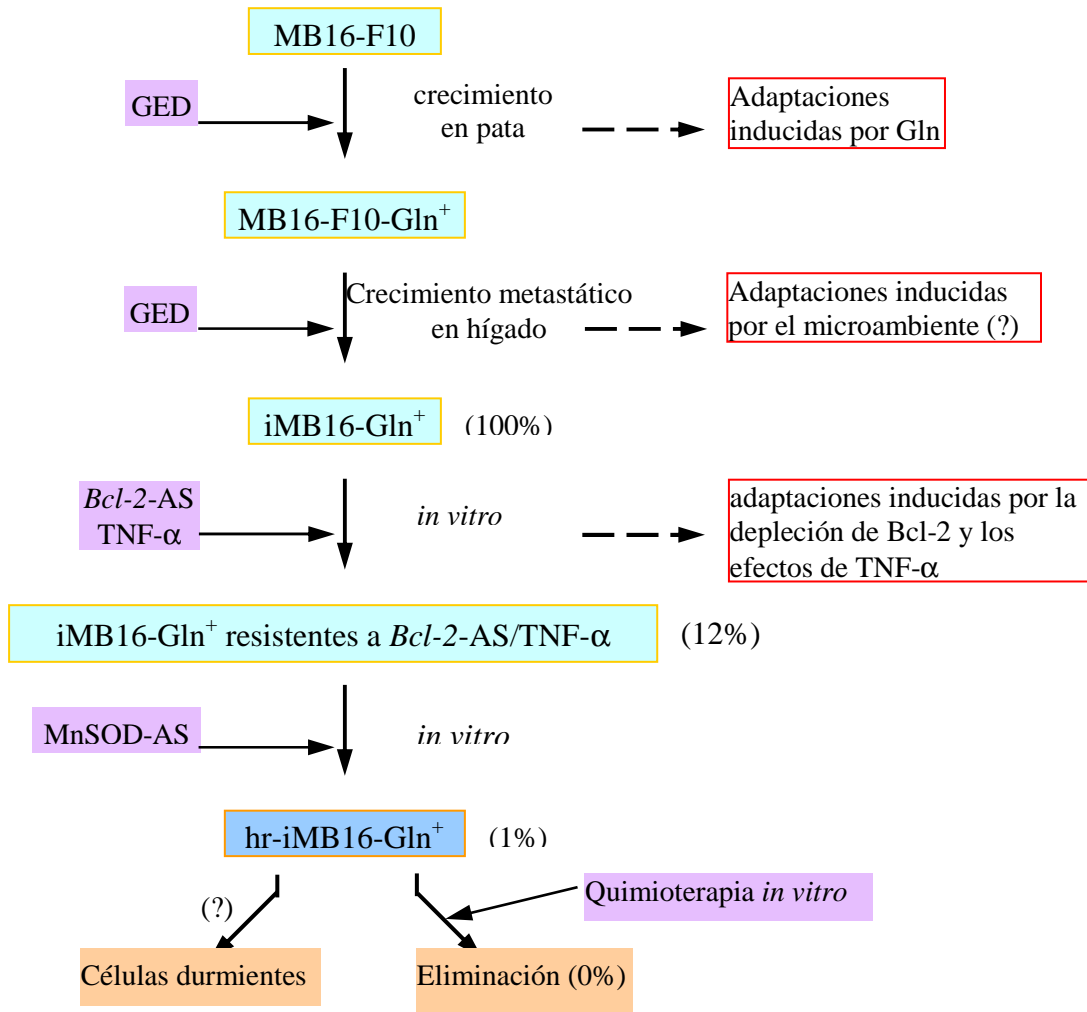


Figura 6. Selección y eliminación de células de melanoma metastático altamente resistentes. Las células iB16M-Gln⁺ se obtuvieron a partir de células B16M-F10

Resultados

tras varios procesos: primero, crecimiento de éstas en la pata de ratones alimentados con GED hasta que mostraron adaptaciones en el metabolismo de L-Gln; segundo, tras aislarlas, se inocularon intraportalmente en ratones para generar metástasis hepáticas, a partir de las cuales se aislaron células metastáticas. Las células iB16M-Gln⁺ que sobrevivieron al tratamiento con *bcl-2*-AS y rmTNF- α incrementaron su expresión de Mn-SOD y CAT.

Tras el tratamiento de iB16M-Gln⁺ con *bcl-2*-AS, *SOD2*-AS y rmTNF- α , sobrevivieron unas pocas células: hr-iB16M-Gln⁺ (células altamente resistentes). Estas células, teóricamente, pueden experimentar nuevas adaptaciones o permanecer como células durmientes; o pueden ser eliminadas con quimioterapia convencional. Con este esquema introducimos el concepto de “adaptaciones dinámicas”: *in vivo*, además de las diferencias en la expresión génica entre células tumorales, las células malignas pueden sufrir múltiples adaptaciones. Estos cambios dinámicos en la expresión génica dependerán principalmente del microambiente y del tipo de terapia o estrés que sufran estas células. El porcentaje de viabilidad celular, antes y después del tratamiento con antisentidos, citokina y quimioterápicos está indicado entre paréntesis.

DISCUSIÓN

1. Depleción selectiva de GSH y regulación de los niveles de Bcl-2.

Las células B16M con un elevado contenido en GSH muestran una mayor capacidad invasiva (Carretero y cols., 1999).

En estudios *in vitro* con células B16M-F10, se observaron niveles de GSH mucho mayores en placas de cultivo donde las células se encontraban a baja densidad (LDB16M) que en placas confluentes (HDB16M). Al inocular estas células intraesplénicamente en ratones, se observó que las células LDB16M tenían mayor potencial metastático en el hígado que las HDB16M. Tratando las placas confluentes con éster de GSH, las células recuperaban tanto los niveles de GSH como la capacidad metastática de las LDB16M. Así mismo, tratando las placas de baja densidad celular con BSO, se inhibía específicamente la síntesis de GSH y se disminuía la actividad metastática (Carretero y cols., 1999).

Durante la interacción entre las células B16M y las del endotelio sinusoidal hepático (HSE), paso previo a la invasión metastática, se activa la liberación de NO, ROS y citocinas proinflamatorias por parte de las endoteliales. Estos ROS/RNS tienen un efecto citotóxico sobre las células más sensibles al estrés oxidativo/nitrosativo, es decir, las células de bajo contenido en GSH; mientras que las células supervivientes sufren una disminución de la actividad γ -GCS (aproximadamente un 41% de los valores control) (Ortega y cols., 2003b).

A la vista de estos resultados, se estudió una posible estrategia para deplecionar el GSH y con ello sensibilizar a las células metastáticas frente al estrés oxidativo/nitrosativo generado por el endotelio vascular.

Con esta idea, se estudiaron los mecanismo moleculares que median la salida de GSH de las células B16M-F10. Nuestro trabajo evidencia que el GSH es transportado al espacio extracelular, principalmente, a través de dos transportadores: MRP1 y CFTR (tabla I y figura 1).

Se han observado en líneas celulares humanas que una depleción de GSH, inducida por la BSO, aumentaba la expresión de Bcl-2 (D'Alessio y cols., 2004). La sobreexpresión de Bcl-2 induce un descenso en la salida de GSH en células B16M-F10 y, consecuentemente, un aumento en el contenido intracelular del tripéptido (Ortega y cols., 2003a). Al comparar esta línea celular de alto contenido metastático con las células B16M-F1 (de bajo potencial metastático), se vio que las primeras sobreexpresaban Bcl-2 (~5.7 veces más). También se vio al utilizar BSO y el oligonucleótido antisentido *bcl-2*-AS que la supervivencia de las células B16M-F10, durante la interacción con el HSE, disminuyó (Ortega y cols., 2003a).

Mediante un sistema de perfusión, donde se mimetizaron las condiciones *in vivo*, utilizamos *bcl-2*-AS [disminuye la salida de GSH vía CFTR (figura 1)] y VRP [actúa sobre el transportador MRP1 acelerando la salida de GSH (Hammond y cols., 2007; Laberge y cols., 2007)] con el fin de facilitar la salida de GSH al medio extracelular. Con dicha estrategia vimos que se duplicó la tasa de salida de GSH (tabla III). Sin embargo, no se conseguía disminuir los niveles de GSH pese a que el transporte aumentaba (Tabla III). Demostramos que este efecto era debido a que la

aceleración de salida al exterior del GSH de la célula se asociaba a un incremento en la síntesis de GSH (tabla IV) dependiente de una sobreexpresión de la γ -GCS (tablas IV y V).

Las células B16M-F10 inducen el aumento de la salida de GSH de los hepatocitos, facilitando así moléculas adicionales del tripéptido a las células tumorales (Obrador y cols., 2002). La actividad γ -GT [que se encuentra sobreexpresada en diversos tumores (Hanigan, 1998)], libera L-cisteína catalizando la degradación del GSH extracelular. Este aporte adicional de Cys es utilizado en la síntesis de GSH y favorece la actividad metastática de las células B16M-F10 (Obrador y cols., 2002). Probamos, por ello, si la inhibición de esta actividad podría prevenir el incremento del contenido de GSH en células B16-F10 tratadas con *bcl-2*-AS y VRP. Para ello se utilizó un inhibidor de γ -GT, la ACV. La utilización de ACV limitó la síntesis de GSH sin alterar la aceleración de su eflujo inducida por acción de *bcl-2*-AS y VRP (tabla VI).

2. Citotoxicidad del endotelio vascular sobre células B16M-F10 con niveles disminuidos de GSH y Bcl-2 .

Uno de los objetivos del presente trabajo era poder provocar una depleción de GSH en las células tumorales de forma selectiva, es decir, sin afectar a los niveles de GSH en los tejidos normales.

Para examinar si la estrategia era útil para cumplir ese objetivo, se realizaron experimentos donde se midieron los niveles de GSH de diferentes tejidos, tanto en ratones con células tumorales (pretratadas con *bcl-2-AS*) y tratados con LPS, VRP y ACV como en ratones control (sin células inoculadas ni tratados). Al analizar los diferentes tejidos tanto de unos ratones como de otros, no se vieron diferencias significativas en los niveles de GSH, con lo cual, la estrategia seguida hasta el momento, no afectaba a los niveles de GSH en células normales, es decir, era selectiva en la depleción de GSH tumoral (apartado 6 de resultados).

Cuando las células metastáticas pretratadas con *bcl-2-AS*, VRP y ACV se cocultivaron con células del HSE, la citotoxicidad inducida por el endotelio sobre las células tumorales fue de un 96% frente al 16% de muerte celular en controles de B16M-F10 no pretratadas (tabla VII). El número de células adheridas no cambió de manera significativa (tabla VII).

Este resultado es similar al que se obtuvo en el 2003 al cocultivar células de melanoma B16M-F10 con GSH y Bcl-2 deplecionados (mediante un tratamiento con BSO y *bcl-2-AS*) donde se consiguió una mortalidad tumoral del 97% durante la interacción con el endotelio (Ortega y cols., 2003a). Sin embargo, de forma diferente a ese trabajo, la estrategia desarrollada en la presente memoria, utiliza moléculas que, a diferencia del BSO, parece generar una depleción selectiva de GSH en células tumorales *in vivo*.

Tras aplicar la metodología propuesta *in vivo*, se consiguió disminuir la viabilidad de las células tumorales de forma notable (~55%); de hecho, cuando se utilizó LPS [activa a las células endoteliales, aumentando la producción de ROS y RNS por parte de éstas (Chan y

Murphy, 2003) y el sistema inmune del organismo], se consiguió reducir el porcentaje de células tumorales viables a tan sólo un 10% de los valores control (tabla VIII). Con la estrategia propuesta quedan, pues, algunas células metastáticas supervivientes. Estas células invasivas pueden prolongar la supervivencia en condiciones de latencia (Holmgren y cols., 1995) o pueden beneficiarse de mecanismos moleculares prometastáticos inducidos por el estrés oxidativo/nitrosativo, como son un aumento de la expresión de moléculas de adhesión (Sellak y cols., 1994), la activación del factor de transcripción Egr-1 (gen de respuesta de crecimiento temprano) (Datta y cols., 1992), la activación de metaloproteasas (Lafrenie y cols., 1992), o el aumento de la resistencia al estrés oxidativo/nitrosativo (Davies, 1999).

Se ha visto que las células invasivas de B16M-F10 que sobreviven a la interacción *in vitro* con el HSE, muestran un impedimento transitorio en el sistema mitocondrial de transporte del GSH (Ortega y cols., 2003b). El mtGSH es uno de los efectores endógenos que regulan el PTPC mitocondrial (Kroemer y Reed, 2000), y con ello la entrada de la célula en apoptosis. Por esto, se planteó si una estrategia dirigida a deplecionar el mtGSH podría hacer a las células B16M-F10 más susceptibles a entrar en apoptosis.

3. GSH mitocondrial y supervivencia tumoral.

Las células B16M-F10 con bajos niveles de mtGSH son altamente susceptibles al estrés oxidativo/nitrosativo inducido por el TNF- α (Ortega y cols., 2003b); hecho que se ve potenciado cuando previamente se aplica terapia con el antisentido *bcl-2*-AS (Ortega y cols., 2003a). Con lo que la

terapia de depleción selectiva de GSH y Bcl-2, puede potenciarse al combinarla con dosis no tóxicas de TNF- α o, también, con una dieta enriquecida en L-Gln, que aumenta los niveles citosólicos de L-Glu en células tumorales (Ehrlich) *in vivo*, lo cual induce una inhibición competitiva en el transporte mitocondrial de GSH (Carretero y cols., 2000).

La Gln es utilizada como sustrato energético preferente por diferentes tipos de tumores de rápida proliferación (Kovacevic, 1971); es oxidada a mayor velocidad que la glucosa y que otros aminoácidos por tumores como por ejemplo el clásico tumor ascítico de Ehrlich (Lazo, 1981).

Diversos estudios indican que un suplemento de L-Gln estimula la producción de GSH en los tejidos del huésped, y sin embargo disminuye los niveles de GSH tumorales en un modelo de sarcoma (Klimberg y cols., 1992a; Klimberg y cols., 1992b).

Diferentes estudios sugieren que, en células normales, un suplemento de L-Gln aumenta su resistencia a la radiación y la quimioterapia; mientras que en las células tumorales regula el GSH de forma negativa, incrementando la sensibilidad a la terapia (Todorova y cols., 2004) (Rouse y cols., 1995).

Es más, se ha visto que una dieta enriquecida en L-Gln puede causar una depleción selectiva de mtGSH en células tumorales (Obrador y cols., 2001), lo que puede facilitar el daño inducido por el TNF- α , por ejemplo la peroxidación lipídica, una pérdida de las funciones mitocondriales, apertura del PTPC, y la liberación de señales moleculares proapoptóticas al espacio citosólico (figura 4 y tabla XII).

En el presente trabajo se desarrolla una metodología para obtener células malignas “adaptadas a L-Gln” (tablas IX y X) (con un potencial metastático elevado), sobre las que se estudia la depleción de mtGSH; en la tabla XI se puede observar como con la dieta enriquecida en L-Gln se consiguen disminuir los niveles de mtGSH pero no del citGSH; datos que concuerdan con lo escrito previamente (Carretero y cols., 2000).

Al inocular subcutáneamente células B16M-F10 en la pata de ratón, existen diferencias entre ratones portadores del tumor alimentados con SD y los alimentados con GED; la dieta GED amortigua el descenso de masa corporal que experimentan los ratones portadores de células tumorales (tabla I). También se observó un descenso en la salida de L-Gln del músculo esquelético, lo que sugiere que la dieta GED tiene propiedades anticaquéxicas. Este dato concuerda con resultados obtenidos en ensayos clínicos a los que se les administraba una dieta enriquecida con L-Gln a pacientes con diversos tipos de tumores (Oguz y cols., 2007; Siddiqui y cols., 2006).

La L-Gln, metabolizada por la glutaminasa mitocondrial, genera L-Glu. En el presente trabajo, se estudió *in vitro* cómo varía el transporte del GSH a la mitocondria utilizando concentraciones variables de L-Glu en el medio de incubación (equivalentes a las determinadas en el citosol de las células B16M-F10-Gln⁺). Con estos niveles de L-Glu se consiguió disminuir el transporte a la mitocondria (figura 3).

En conclusión, una dieta GED es un método factible para deplecionar los niveles de mtGSH.

Recientemente se ha observado que la muerte celular en las células B16M-F10 se activa, *in vitro*, cuando los niveles de mtGSH disminuyen

hasta un 30% de los valores control; sin embargo, este nivel crítico se situaba en tan sólo un 60% de los valores control cuando, previamente, cuando se trataban las células con *bcl-2*-AS (Ortega y cols., 2003a).

Al inocular vía porta células B16M-F10 o B16M-F10-Gln⁺, se consiguieron aislar, tras 10 días, células invasivas iB16M o iB16M-Gln⁺ localizadas en focos metastáticos hepáticos.

La adición *in vitro* de TNF- α tuvo como consecuencia la disminución del mtGSH tanto en células iB16M (disminuye un 30% con respecto a los valores control) como iB16M-Gln⁺ (disminuye un 70% con respecto a los valores control en células iB16M) (figura 4).

Cuando las células iB16M-Gln⁺ se trataron con una combinación de *bcl-2*-AS y rmTNF- α , no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de mtGSH conseguidos en células iB16M-Gln⁺ tratadas con rmTNF- α ; pero su viabilidad disminuyó un 88% con respecto al control (figura 4).

Este porcentaje de células invasivas resistentes debe corresponder a células que sufren mayores adaptaciones. Por ejemplo, se ha visto que una depleción de GSH celular produce un aumento de las actividades antioxidantes como son GPx, GR o la actividad SOD (Cu/Zn-SOD, principalmente) en células neuronales Ht22 (Chen y cols., 2005).

Las células invasivas iB16M-Gln⁺ resistentes al tratamiento con *bcl-2*-AS y TNF- α , sufren un aumento de los niveles de ROS intracelular debido fundamentalmente al mecanismo intracelular activado por la citokina.

Al estudiar cómo afectaba la generación de ROS y la depleción de mtGSH en la actividad de enzimas antioxidantes, vimos que las actividades

Mn-SOD y CAT estaban sobreexpresadas en estas células resistentes (tabla XIII).

Estudios en el 2000 indicaron que la SOD podía ser una diana crítica para inducir muerte selectiva de células cancerosas, y que la combinación de un mecanismo basado en inhibidores de SOD y agentes inductores de la generación de radicales libres, podía tener aplicaciones clínicas (Huang y cols., 2000). Estudios recientes han probado que la utilización de cis-FeMPy(2)P(2)P (un mimetizador de la SOD cuya función en las células es más como pro-oxidante que como anti-oxidante) tenía una mayor toxicidad sobre diferentes líneas de células tumorales cuando se trataban también con un antisentido anti-SOD; es decir, que aumentaba la mortalidad celular cuando disminuían los niveles de SOD en las células tumorales (Asayama y cols., 2007).

Estudios *in vivo* demuestran que las SOD pueden estar sobreexpresadas en tumores agresivos humanos, y que esta actividad enzimática se relaciona con un mal pronóstico y con una resistencia a fármacos citotóxicos o a la radiación (Al-Gayyar y cols., 2007; Harju y cols., 2004; Pani y cols., 2004).

Paradójicamente, en diferentes tipos de células tumorales [incluyendo las células de melanoma humano (Church y cols., 1993; Sander y cols., 2003)], el aumento de la expresión de Mn-SOD se correlaciona con una supresión de la transformación neoplásica, disminución del potencial metastático y la proliferación *in vitro*, y una reversión del fenotipo maligno (Kinnula y Crapo, 2004).

En nuestro estudio, incluimos por ello un oligonucleótido antisentido anti-*SOD*, *SOD2-AS* combinándolo con el tratamiento con *bcl-2-AS* y $\text{TNF-}\alpha$ sobre células adaptadas a L-Gln.

La viabilidad celular disminuyó con esta estrategia combinada hasta alcanzar aproximadamente un 1% de células supervivientes (tabla XIV). Estos resultados concuerdan con observaciones previas donde, por ejemplo, una supresión de la actividad Mn-SOD mediante un antisentido anti-Mn-SOD reduce las propiedades invasivas de células tumorales MDA-MB321 (Kattan y cols., 2007).

El descenso de actividad Mn-SOD que se alcanza con los oligos antisentido conlleva una sensibilización al estrés oxidativo/nitrosativo (por ejemplo el generado por $\text{TNF-}\alpha$, interferón- γ , radiación ionizante, hipertermia, etc.) (Kinnula y Crapo, 2004).

Las células resistentes que sobreviven al tratamiento con *bcl-2-AS*, *SOD2-AS* y $\text{TNF-}\alpha$ y están adaptadas a la L-Gln (~1% de la población inicial), se puede tratar con quimioterapia y/o radiaciones con el fin de eliminarlas y prevenir su supervivencia en condiciones de latencia (Cairns y cols., 2003).

En nuestro modelo experimental, al aplicar una combinación de taxol y daunorrubicina, se consiguió eliminar completamente a las células hr-iB16M-Gln⁺ supervivientes (ver apartado 11 de resultados y la figura 5 adjunta a él).

Estos resultados se consiguieron al aplicar la estrategia *in vitro*. *In vivo* la situación cambia debido a las múltiples interacciones que se generan entre las células tumorales y el microambiente donde se

desenvuelven. Un escenario que puede complicar o comprometer al éxito de la multiterapia que proponemos.

Las estrategias propuestas en el presente trabajo (la depleción del citGSH y Bcl-2, junto con la depleción de mtGSH y Mn-SOD mitocondrial), podría facilitar la eliminación *in vivo* de las células B16M metastáticas mediante bioterapia, quimioterapia y/o radioterapia.

4. Posible aplicación clínica derivada de este estudio.

Los estudios de **terapias con oligonucleótidos antisentidos** son cada vez más numerosos. Existen diversos tipos de oligonucleótidos patentados contra diversas moléculas implicadas en el desarrollo tumoral.

la utilización del oligonucleótido antisentido contra Bcl-2, G3139 (oligonucleótido de 18 pares de bases fosfotioato, complementario a los seis primeros codones del mRNA de *bcl-2*), induce apoptosis en diferentes líneas de células tumorales humanas y murinas. Por ejemplo, en las células de melanoma humano 518A2 se ha visto que, *in vitro*, G3139 promueve la entrada a la apoptosis de forma independiente de Bcl-2 (Lai y cols., 2005) e, *in vivo*, afecta la habilidad de proliferación celular (Benimetskaya y cols., 2006).

La terapia antisentido contra la proteína Bcl-2 se encuentra en fase clínica III para melanoma, mieloma, leucemia mieloide y leucemia linfática crónica (Bedikian y cols., 2006; O'Brien y cols., 2007). Se ha probado esta terapia en pacientes con melanomas metastáticos (estadios III o IV), quirúrgicamente inoperables, combinando la molécula G3139 con

dacarbacina (quimioterápico de elección), observando una mejora en la eficacia del fármaco e incrementando la supervivencia de los pacientes (2,6 meses de media comparando con 1,6 meses de media de los pacientes tratados sólo con dacarbacina) (Bedikian y cols., 2006).

En el caso del oligonucleótido antisentido contra la Mn-SOD, la posibilidad de utilizarse *in vivo* es factible, puesto que ha sido utilizado en ratas en estudios de la relación entre ejercicio físico y protección contra las arritmias (Hamilton y cols., 2004; Lennon y cols., 2004).

En nuestra terapia experimental también hemos utilizado una **dieta enriquecida en L-Gln**. Este aminoácido se aplica en clínica en pacientes oncológicos, principalmente por su papel protector en casos de cáncer gastrointestinal. Es útil en la prevención de infecciones postoperatorias (Zheng y cols., 2007) y mucositis en pacientes con trasplante de médula ósea (Storey, 2007).

Se ha visto cómo, en ratas con tumor de mama inducido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), una dieta rica en Gln disminuían los niveles de GSH y Bcl-2 y aumentaban la expresión de Bax y caspasa-3 en las células tumorales; también se observó que aumentaban los niveles de GSH en los tejidos normales y la actividad de las células “natural killer” (Kaufmann y cols., 2003; Klimberg y cols., 1996; Todorova y cols., 2004).

Para conseguir aumentar el eflujo de GSH de las células tumorales B16M-F10, utilizamos en nuestro estudio **VRP** y **ACV** en combinación con el *bcl-2*-AS. VRP y ACV son fármacos utilizados en la clínica de diversas patologías.

El **VRP**, a parte de su función sobre las proteínas MRPs, es un bloqueador de canales calcio perteneciente a la familia de las

bencilalquilaminas e induce la dilatación arterial y disminución de la resistencia vascular periférica (RVP). La caída de esta resistencia es mayor en los pacientes más hipertensos con RVP más elevada, lo cual justifica considerar a este fármaco como “antihipertensivo” más que como “hipotensor” (Hansen y Mellemggaard, 1999; Messerli, 2002; Sahney, 2006).

El VRP tiene diferentes aplicaciones como por ejemplo el tratamiento de las manías y la profilaxis de las migrañas [se utiliza en la prevención de esta enfermedad (Modi y Lowder, 2006)], en los casos de angina de pecho (Eisenberg y cols., 2004; Hansen y Mellemggaard, 1999), etc. Las diferentes presentaciones de este fármaco en el mercado, están diseñadas para cada aplicación, desde comprimidos de liberación sostenida para la angina hasta gotas oftálmicas para el tratamiento de la hipertensión ocular o el glaucoma.

En las investigaciones oncológicas, se ha estudiado sus diferentes efectos sobre los canales MDR :

- Se ha estudiado ampliamente cómo el VRP, inhibidor de la p-glicoproteína, podía ayudar a sensibilizar a las células tumorales frente a diversos fármacos transportados fuera de las células por estos canales. Este es el caso de las antraciclinas, como por ejemplo la doxorubicina (DOX), se ha visto que la utilización de VRP potencia el efecto de DOX en células humanas de tumor de colon (Garrido y cols., 1995; Toffoli y cols., 1996).

- También se ha visto cómo la utilización de VRP, inhibe, vía MRP1, la salida de daunorrubicina de las células tumorales, mientras que se duplica el transporte de GSH celular, favoreciendo así la entrada en

apoptosis de diferentes células tumorales (Laberge y cols., 2007; Salerno y cols., 2004).

La aplicación en la clínica oncológica del VRP, presenta dificultades asociadas a su toxicidad cardiovascular a concentraciones óptimas *in vitro* (Cao y cols., 2005; Ozols y cols., 1987). Por ello, han surgido a lo largo de estos últimos años gran variedad de compuestos derivados del VRP que presentan una menor toxicidad cardiovascular (Biscardi y cols., 2006).

La utilización del fármaco VRP en nuestro estudio se llevó a cabo dentro de niveles en plasma aceptables clínicamente [la concentración máxima se encuentra en torno a 2 μ M (Raderer y Scheithauer, 1993)].

La ACV se ha estudiado en diferentes tumores y ha llegado a fases clínicas I y II (Hidalgo y cols., 1998). Sin embargo, su uso está limitado por su toxicidad en el sistema nervioso central. Su dosis máxima tolerada es aproximadamente de 50mg/m²/día, aunque se ha demostrado que la combinación con una solución completa de aminoácidos puede minimizar dicha toxicidad (Hidalgo y cols., 1998).

La bioterapia (citokinas) se utiliza hoy en día como un tratamiento más en diversos tipos de tumores. De hecho, está considerada como el cuarto tipo de tratamiento antitumoral convencional (Oldham, 1986). Pero, en muchos casos, generan graves efectos secundarios en los pacientes como por ejemplo fatiga, hipotensión (Lissoni y cols., 1996), o en casos extremos, colapso cardiovascular debido principalmente al exceso de NO inducido por el TNF- α (Cauwels y Brouckaert, 2007).

Queda por último, mencionar la **quimioterapia**. Daunorrubicina y taxol son quimioterápicos clásicos utilizados en el tratamiento tumoral en

Discusión

pacientes. Como se menciona en el apartado 11 de resultados, los utilizamos a dosis clínicas pautables.

Podemos concluir que es factible aplicar *in vivo* las estrategias propuestas en el presente trabajo. Nuestro siguiente objetivo, por ello, es desarrollar una terapia que pueda alcanzar, en un plazo razonable, fase clínica I con pacientes de melanomas malignos en estadios avanzados.

CONCLUSIONES

- Los mecanismos de transporte de GSH al espacio extracelular, en las células de melanoma B16 con alto poder metastático, son la MRP-1 y un sistema dependiente de Bcl-2.
- El CFTR corresponde con el canal sensible a Bcl-2.
- El uso combinado de VRP (activador de MRP) y *bcl-2-AS*, incrementó la velocidad de transporte de GSH al medio extracelular. Dicho incremento se asoció con una aceleración en la síntesis intracelular de GSH.
- La inhibición de la actividad de γ -GT inducida con ACV, previene el aumento en la síntesis de GSH en células B16M-F10 tratadas con el antisentido y VRP. Con este tratamiento combinado se consigue la depleción del citGSH.
- Las células tratadas con *bcl-2-AS*, VRP y ACV se sensibilizan a la acción citotóxica inducida por el endotelio vascular. Este tratamiento selectivo aumenta la citotoxicidad celular frente a las células tratadas con BSO (depleción de GSH no selectivo), aunque *in vivo* no consigue una eliminación del tumor completa.
- Las células adaptadas a L-Gln (B16M-F10-Gln⁺) tienen disminuidos los niveles de mtGSH, mientras que los niveles de citGSH se mantienen.
- El tratamiento de las células B16M-F10-Gln⁺ con *bcl-2-AS* facilita la citotoxicidad inducida por el TNF- α , aun cuando los niveles de mtGSH estén por encima del límite crítico (~30% de los valores control).
- El tratamiento de células B16M-F10-Gln⁺ invasivas (B16M-Gln⁺) con *bcl-2-AS* y TNF- α disminuye el potencial de membrana mitocondrial y aumenta los niveles citosólicos de Citocromo c y la actividad caspasa 3, induciendo la muerte celular. Sin embargo, las

células que sobreviven se adaptan aumentando la actividad de enzimas antioxidantes (Mn-SOD y CAT), aumentando su resistencia al estrés oxidativo.

- Los niveles de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (aumentados en células B16M-Gln⁺ tratadas con TNF- α , *bcl-2*-AS y *SOD2*-AS) inducen muerte celular hasta alcanzar sólo un 1% de células malignas viables (hr-B16M-Gln⁺).
- El tratamiento de las células hr-iB16M-Gln⁺ con quimioterapia consigue eliminar a esa subpoblación de células metastáticas altamente resistentes *in vitro*.
- Las estrategias propuestas en el presente trabajo podrían facilitar la eliminación *in vivo* de las células B16M metastáticas mediante bioterapia, quimioterapia y/o radioterapia.

BIBLIOGRAFÍA

Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-6.

Afanas'ev, I. B. (2006). "Competition between superoxide and hydrogen peroxide signaling in heterolytic enzymatic processes." Med Hypotheses **66**(6): 1125-8.

Agarwal, D., S. Goodison, B. Nicholson, D. Tarin and V. Urquidi (2003). "Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenic human breast cancer model." Differentiation **71**(2): 114-25.

Aggeli, I. K., C. Gaitanaki and I. Beis (2006). "Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells." Cell Signal **18**(10): 1801-12.

Akerboom, T. P. and H. Sies (1981). "Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples." Methods Enzymol **77**: 373-82.

Al-Gayyar, M. M., L. A. Eissa, A. M. Rabie and A. M. El-Gayar (2007). "Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients." J Pharm Pharmacol **59**(3): 409-17.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). Molecular Biology of the Cell U. Garland Publishing Inc. 4th edition

Aleksandrov, A. A., L. A. Aleksandrov and J. R. Riordan (2007). "CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel." Pflugers Arch **453**(5): 693-702.

Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak and P. R. Clarke (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol **5**(7): 647-54.

Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna and M. M. Gottesman (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." Oncogene **22**(47): 7468-85.

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**(17): 7915-22.

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**(5): 1249-56.

Aoki, H., Y. Takada, S. Kondo, R. Sawaya, B. Aggarwal and Y. Kondo (2007). "Evidence That Curcumin Suppresses the Growth of Malignant Gliomas In Vitro and In Vivo Through Induction of Autophagy: Role of Akt and ERK Signaling Pathways." Mol Pharmacol.

Arrick, B. A. and C. F. Nathan (1984). "Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review." Cancer Res **44**(10): 4224-32.

Arrigo, A. P. (1999). "Gene expression and the thiol redox state." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 936-44.

Asayama, S., N. Kasugai, S. Kubota, S. Nagaoka and H. Kawakami (2007). "Superoxide dismutase as a target enzyme for Fe-porphyrin-induced cell death." J Inorg Biochem **101**(2): 261-6.

Aw, T. Y., M. Ookhtens and N. Kaplowitz (1984). "Inhibition of glutathione efflux from isolated rat hepatocytes by methionine." J Biol Chem **259**(15): 9355-8.

Aw, T. Y., M. Ookhtens and N. Kaplowitz (1986). "Mechanism of inhibition of glutathione efflux by methionine from isolated rat hepatocytes." Am J Physiol **251**(3 Pt 1): G354-61.

Bacon, B. R., A. S. Tavill, G. M. Brittenham, C. H. Park and R. O. Recknagel (1983). "Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload." J Clin Invest **71**(3): 429-39.

Bahi, N., J. Zhang, M. Llovera, M. Ballester, J. X. Comella and D. Sanchis (2006). "Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes." J Biol Chem **281**(32): 22943-52.

Baker, A. H., D. R. Edwards and G. Murphy (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3719-27.

Balakrishnan, A., F. E. Bleeker, S. Lamba, M. Rodolfo, M. Daniotti, A. Scarpa, A. A. van Tilborg, S. Leenstra, C. Zanon and A. Bardelli (2007). "Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma." Cancer Res **67**(8): 3545-50.

Balbin, M., A. Fueyo, A. M. Tester, A. M. Pendas, A. S. Pitiot, A. Astudillo, C. M. Overall, S. D. Shapiro and C. Lopez-Otin (2003). "Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice." Nat Genet **35**(3): 252-7.

Ballatori, N., C. L. Hammond, J. B. Cunningham, S. M. Krance and R. Marchan (2005). "Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins." Toxicol Appl Pharmacol **204**(3): 238-55.

Bannai, S. and N. Tateishi (1986). "Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals." J Membr Biol **89**(1): 1-8.

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**(14): 3845-52.

Bedikian, A. Y., M. Millward, H. Pehamberger, R. Conry, M. Gore, U. Trefzer, A. C. Pavlick, R. DeConti, E. M. Hersh, P. Hersey, J. M. Kirkwood and F. G. Haluska (2006). "Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group." J Clin Oncol **24**(29): 4738-45.

Behne, D. and A. Kyriakopoulos (2001). "Mammalian selenium-containing proteins." Annu Rev Nutr **21**: 453-73.

Behrens, J. (1999). "Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 15-30.

Bellomo, G., S. A. Jewell and S. Orrenius (1982). "The metabolism of menadione impairs the ability of rat liver mitochondria to take up and retain calcium." J Biol Chem **257**(19): 11558-62.

Benimetskaya, L., K. Ayyanar, N. Kornblum, D. Castanotto, J. Rossi, S. Wu, J. Lai, B. D. Brown, N. Popova, P. Miller, H. McMicken, Y. Chen and C. A. Stein (2006). "Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells in vivo and in vitro." Clin Cancer Res **12**(16): 4940-8.

Bergendi, L., L. Benes, Z. Durackova and M. Ferencik (1999). "Chemistry, physiology and pathology of free radicals." Life Sci **65**(18-19): 1865-74.

Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.

Bergmeyer, H. U., J. Bergmeyer and M. Bral (1974). Methods of Enzymatic Analysis

Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-6.

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**(4895): 1160-5.

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**(1): 11-26.

Biroccio, A., C. Leonetti and G. Zupi (2003). "The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments." Oncogene **22**(42): 6579-88.

Biscardi, M., E. Teodori, R. Caporale, R. Budriesi, F. Balestri, B. Scappini, S. Gavazzi and A. Grossi (2006). "Multidrug reverting activity toward leukemia cells in a group of new verapamil analogues with low cardiovascular activity." Leuk Res **30**(1): 1-8.

Bockhorn, M., R. K. Jain and L. L. Munn (2007). "Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?" Lancet Oncol **8**(5): 444-8.

Bode, B. P. and W. W. Souba (1994). "Modulation of cellular proliferation alters glutamine transport and metabolism in human hepatoma cells." Ann Surg **220**(4): 411-22; discussion 422-4.

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**(1): 92-102.

Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-302.

Bos, J. L. (1998). "All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral." Embo J **17**(23): 6776-82.

Bottger, A. and O. Alexandrova (2007). "Programmed cell death in Hydra." Semin Cancer Biol **17**(2): 134-46.

Boumendjel, A., H. Baubichon-Cortay, D. Trompier, T. Perrotton and A. Di Pietro (2005). "Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents." Med Res Rev **25**(4): 453-72.

Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-16.

Bowen, I. D., J. E. den Hollander and G. H. Lewis (1982). "Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis* lijima." Differentiation **21**(3): 160-7.

Braig, M., S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A. H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dorken, T. Jenuwein and C. A. Schmitt (2005). "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." Nature **436**(7051): 660-5.

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**(5): 370-3.

Brenner, C. and S. Grimm (2006). "The permeability transition pore complex in cancer cell death." Oncogene **25**(34): 4744-56.

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**(7): 1157-64.

Brown, G. C. (1999). "Nitric oxide and mitochondrial respiration." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 351-69.

Brune, B., A. von Knethen and K. B. Sandau (1999). "Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis." Cell Death Differ **6**(10): 969-75.

Brzeska, H., J. Szczepanowska, F. Matsumura and E. D. Korn (2004). "Rac-induced increase of phosphorylation of myosin

regulatory light chain in HeLa cells." Cell Motil Cytoskeleton **58**(3): 186-99.

Buckley, I. K. (1972). "A light and electron microscopic study of thermally injured cultured cells." Lab Invest **26**(2): 201-9.

Buchanan, F. G., W. Chang, H. Sheng, J. Shao, J. D. Morrow and R. N. DuBois (2004). "Up-regulation of the enzymes involved in prostacyclin synthesis via Ras induces vascular endothelial growth factor." Gastroenterology **127**(5): 1391-400.

Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo and X. Wang (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.

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." Am J Physiol **268**(1 Pt 1): L21-6.

Bundy, R. E., N. Marczin, A. H. Chester and M. Yacoub (2000). "A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells." Br J Pharmacol **129**(7): 1513-21.

Burdon, R. H. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." Free Radic Biol Med **18**(4): 775-94.

Burdon, R. H., D. Alliangana and V. Gill (1995). "Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells." Free Radic Res **23**(5): 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**(18): 4768-75.

Bursch, W., A. Ellinger, H. Kienzl, L. Torok, S. Pandey, M. Sikorska, R. Walker and R. S. Hermann (1996). "Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy." Carcinogenesis **17**(8): 1595-607.

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." Arch Biochem Biophys **180**(2): 248-57.

Cairns, J. (1975). "Mutation selection and the natural history of cancer." Nature **255**(5505): 197-200.

Cairns, R. A., R. Khokha and R. P. Hill (2003). "Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view." Curr Mol Med **3**(7): 659-71.

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**(9): 2541-6.

Campisi, J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism." Trends Cell Biol **11**(11): S27-31.

Cao, Q. Z., G. Niu and H. R. Tan (2005). "In vitro growth inhibition of human colonic tumor cells by Verapamil." World J Gastroenterol **11**(15): 2255-9.

Cao, Y. (2005). "Tumor angiogenesis and therapy." Biomed Pharmacother **59 Suppl 2**: S340-3.

Cao, Y. and Q. Liu (2007). "Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis." Adv Cancer Res **97**: 203-24.

Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." Blood **84**(7): 2068-101.

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**(7): 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**(28): 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**(9): 913-23.

Cauwels, A. and P. Brouckaert (2007). "Survival of TNF toxicity: Dependence on caspases and NO." Arch Biochem Biophys **462**(2): 132-9.

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nat Rev Cancer **4**(2): 118-32.

Cavalli, L. R. and B. C. Liang (1998). "Mutagenesis, tumorigenicity, and apoptosis: are the mitochondria involved?" Mutat Res **398**(1-2): 19-26.

Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) **181**(3): 195-213.

Cole, M. D. and M. A. Nikiforov (2006). "Transcriptional activation by the Myc oncoprotein." Curr Top Microbiol Immunol **302**: 33-50.

Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.

Coll, O., A. Colell, C. Garcia-Ruiz, N. Kaplowitz and J. C. Fernandez-Checa (2003). "Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion." Hepatology **38**(3): 692-702.

Coman, D. R. (1944). "Decreased mutual adhesiveness, a property of cells from squamous cell carcinomas." Cancer Res **4**: 625-629.

Condeelis, J. and J. E. Segall (2003). "Intravital imaging of cell movement in tumours." Nat Rev Cancer **3**(12): 921-30.

Costa, L. G. and S. D. Murphy (1986). "Effect of diethylmaleate and other glutathione depletors on protein synthesis." Biochem Pharmacol **35**(19): 3383-8.

Costantini, P., E. Jacotot, D. Decaudin and G. Kroemer (2000). "Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy." J Natl Cancer Inst **92**(13): 1042-53.

Costea, D. E., O. Tsinkalovsky, O. K. Vintermyr, A. C. Johannessen and I. C. Mackenzie (2006). "Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma." Oral Dis **12**(5): 443-54.

Cowling, V. H. and M. D. Cole (2006). "Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins." Semin Cancer Biol **16**(4): 242-52.

Cullen, K. V., R. A. Davey and M. W. Davey (2001). "Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells." Biochem Pharmacol **62**(4): 417-24.

Chambers, A. F. and L. M. Matrisian (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst **89**(17): 1260-70.

Chan, E. L. and J. T. Murphy (2003). "Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-kappaB activation." J Surg Res **111**(1): 120-6.

Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.

Chappe, V., T. Irvine, J. Liao, A. Evagelidis and J. W. Hanrahan (2005). "Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain." Embo J **24**(15): 2730-40.

Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull **49**(3): 481-93.

Chen, J., A. Small-Howard, A. Yin and M. J. Berry (2005). "The responses of Ht22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO)." BMC Neurosci **6**(1): 10.

Chen, M. K., N. J. Espat, K. I. Bland, E. M. Copeland, 3rd and W. W. Souba (1993). "Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney." Ann Surg **217**(6): 655-66; discussion 666-7.

Chen, Z., D. A. Putt and L. H. Lash (2000). "Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport." Arch Biochem Biophys **373**(1): 193-202.

Church, S. L., J. W. Grant, L. A. Ridnour, L. W. Oberley, P. E. Swanson, P. S. Meltzer and J. M. Trent (1993). "Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 3113-7.

D'Alessio, M., C. Cerella, C. Amici, C. Pesce, S. Coppola, C. Fanelli, M. De Nicola, S. Cristofanon, G. Clavarino, A. Bergamaschi, A. Magrini, G. Gualandi and L. Ghibelli (2004). "Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells." Faseb J **18**(13): 1609-11.

D'Amore, P. A. and D. T. Shima (1996). "Tumor angiogenesis: a physiological process or genetically determined?" Cancer Metastasis Rev **15**(2): 205-12.

Dai, L. C., X. Wang, X. Yao, Y. L. Lu, J. L. Ping and J. F. He (2007a). "Enhanced therapeutic effects of combined

chemotherapeutic drugs and midkine antisense oligonucleotides for hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **13**(13): 1989-94.

Dai, L. C., X. Wang, X. Yao, L. S. Min, J. L. Ping and J. F. He (2007b). "Antisense oligonucleotides targeting midkine inhibit tumor growth in an in situ human hepatocellular carcinoma model." Acta Pharmacol Sin **28**(3): 453-8.

Daniel, W. W. and A. Brunshwig (1961). "The management of recurrent carcinoma of the cervix following simple total hysterectomy." Cancer **14**: 582-6.

Dano, K., P. A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen and L. Skriver (1985). "Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer." Adv Cancer Res **44**: 139-266.

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**(35): 8300-6.

Davies, K. J. (1999). "The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress." IUBMB Life **48**(1): 41-7.

Day, T. W., F. Najafi, C. H. Wu and A. R. Safa (2006). "Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis." Biochem Pharmacol **71**(11): 1551-61.

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**(2): 284-91.

de Fraipont, F. (2007). "[Contribution of molecular biology to new diagnostic and/or prognostic markers characterization in cancerogenesis]." Ann Biol Clin (Paris) **65**(1): 21-6.

Debnath, J., E. H. Baehrecke and G. Kroemer (2005). "Does autophagy contribute to cell death?" Autophagy **1**(2): 66-74.

Del Bufalo, D., A. Biroccio, C. Leonetti and G. Zupi (1997). "Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line." Faseb J **11**(12): 947-53.

Deneke, S. M., D. F. Baxter, D. T. Phelps and B. L. Fanburg (1989). "Increase in endothelial cell glutathione and precursor amino acid uptake by diethyl maleate and hyperoxia." Am J Physiol **257**(4 Pt 1): L265-71.

Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 9-34.

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**(3): 263-9.

Diaz, D., C. M. Krejsa and T. J. Kavanagh (2002). "Expression of glutamate-cysteine ligase during mouse development." Mol Reprod Dev **62**(1): 83-91.

Dimitroff, C. J., M. Lechpammer, D. Long-Woodward and J. L. Kutok (2004). "Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin." Cancer Res **64**(15): 5261-9.

Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta and J. Campisi (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." Mol Cell Biol **20**(1): 273-85.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.

Dong, H. M., G. Liu, Y. F. Hou, J. Wu, J. S. Lu, J. M. Luo, Z. Z. Shen and Z. M. Shao (2007). "Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro." J Cancer Res Clin Oncol **133**(2): 83-92.

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**(12): 9074-8.

Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi and D. D. Ross (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-70.

Dreher, D. and A. F. Junod (1996). "Role of oxygen free radicals in cancer development." Eur J Cancer **32A**(1): 30-8.

Droge, W., H. P. Eck, M. Betzler, P. Schlag, P. Drings and W. Ebert (1988). "Plasma glutamate concentration and lymphocyte activity." J Cancer Res Clin Oncol **114**(2): 124-8.

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**(1): 33-42.

Duc-Goiran, P., T. M. Mignot, C. Bourgeois and F. Ferre (1999). "Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **83**(1): 85-100.

Dzurik, R., Z. Krivosikova, K. Stefikova and V. Spustova (2006). "Mitochondria and mitochondrial nitric oxide synthase alterations participate in energetical dysbalance, aging and age-related diseases." Bratisl Lek Listy **107**(11-12): 405-11.

Edelman, G. M. and K. L. Crossin (1991). "Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology." Annu Rev Biochem **60**: 155-90.

Eisenberg, M. J., A. Brox and A. N. Bestawros (2004). "Calcium channel blockers: an update." Am J Med **116**(1): 35-43.

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.

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." J Neurochem **67**(3): 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**(12): 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." J Biol Chem **274**(42): 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(1)**: 84-8.

Estrela, J. M., A. Ortega and E. Obrador (2006). "Glutathione in cancer biology and therapy." Crit Rev Clin Lab Sci **43(2)**: 143-81.

Falschlehner, C., C. H. Emmerich, B. Gerlach and H. Walczak (2007). "TRAIL signalling: Decisions between life and death." Int J Biochem Cell Biol.

Feldman, R. J., V. I. Sementchenko, M. Gayed, M. M. Fraig and D. K. Watson (2003). "Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression." Cancer Res **63(15)**: 4626-31.

Feldser, D. M. and C. W. Greider (2007). "Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence." Cancer Cell **11(5)**: 461-9.

Felty, Q. (2006). "Estrogen-induced DNA synthesis in vascular endothelial cells is mediated by ROS signaling." BMC Cardiovasc Disord **6**: 16.

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(1)**: 63-74.

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**(19): 6130-8.

Fidler, I. J. (2000). "Angiogenesis and cancer metastasis." Cancer J **6 Suppl 2**: S134-41.

Fidler, I. J. (2002). "The organ microenvironment and cancer metastasis." Differentiation **70**(9-10): 498-505.

Fidler, I. J. and I. R. Hart (1982). "Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications." Science **217**(4564): 998-1003.

Fidler, I. J., S. J. Kim and R. R. Langley (2006). "The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis." J Cell Biochem.

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**(6): 1867-72.

Fisher, J. C. and J. H. Hollomon (1951). "A hypothesis for the origin of cancer foci." Cancer **4**(5): 916-8.

Flohe, L. and F. Otting (1984). "Superoxide dismutase assays." Methods Enzymol **105**: 93-104.

Foksinski, M., D. Gackowski, R. Rozalski, A. Siomek, J. Guz, A. Szpila, T. Dziaman and R. Olinski (2007). "Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans." Eur J Nutr **46**(3): 174-80.

Folkman, J. (2006). "Angiogenesis." Annu Rev Med **57**: 1-18.

Foo, S. Y. and G. P. Nolan (1999). "NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation." Trends Genet **15**(6): 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**(5): 1123-7.

Freemont, A. J. (1998). "Demystified ... adhesion molecules." Mol Pathol **51**(4): 175-84.

Fridman, R. (2006). "Metalloproteinases and cancer." Cancer Metastasis Rev **25**: 7-8.

Gabbert, H. (1985). "Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations." Cancer Metastasis Rev **4**(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**(2): 203-7.

Gadsby, D. C., G. Nagel and T. C. Hwang (1995). "The CFTR chloride channel of mammalian heart." Annu Rev Physiol **57**: 387-416.

Gadsby, D. C. and A. C. Nairn (1999). "Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S77-S107.

Garbe, C. and T. K. Eigentler (2007). "Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006." Melanoma Res **17**(2): 117-27.

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**(2): 414-9.

Garrido, C., B. Chauffert, D. Pinard, F. Tibaut, P. Genne, M. Assem and M. T. Dimanche-Boitrel (1995). "Circumvention of confluence-dependent resistance in a human multi-drug-resistant colon-cancer cell line." Int J Cancer **61**(6): 873-9.

Gary, R. K. and S. M. Kindell (2005). "Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts." Anal Biochem **343**(2): 329-34.

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**(2 Pt 1): 538-51.

Germann, U. A. (1996). "P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells." Eur J Cancer **32A**(6): 927-44.

Ghafourifar, P. and C. Richter (1997). "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." FEBS Lett **418**(3): 291-6.

Ghosh, S., T. Pulinilkunnil, G. Yuen, G. Kewalramani, D. An, D. Qi, A. Abrahani and B. Rodrigues (2005). "Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H768-76.

Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-32.

Giavazzi, R., M. Foppolo, R. Dossi and A. Remuzzi (1993). "Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions." J Clin Invest **92**(6): 3038-44.

Gillett, C. E. and D. M. Barnes (1998). "Demystified ... cell cycle." Mol Pathol **51**(6): 310-6.

Giulivi, C., J. J. Poderoso and A. Boveris (1998). "Production of nitric oxide by mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 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**(13): 3805-11.

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**(18): 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**(1): 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**(17): 6758-62.

Gou, S., T. Liu, C. Wang, T. Yin, K. Li, M. Yang and J. Zhou (2007). "Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties." Pancreas **34**(4): 429-35.

Green, D. R. (2005). "Apoptotic pathways: ten minutes to dead." Cell **121**(5): 671-4.

Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.

Green, D. R. and G. Kroemer (2005). "Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?" J Clin Invest **115**(10): 2610-7.

Griffith, O. W. (1999). "Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 922-35.

Griffith, O. W. and A. Meister (1979). "Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5606-10.

Gunter, T. E. and D. R. Pfeiffer (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium." Am J Physiol **258**(5 Pt 1): 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**(2): 422-6.

Gupta, S. (2003). "Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review)." Int J Oncol **22**(1): 15-20.

Hahne, J. C., A. F. Okuducu, A. Kaminski, A. Florin, F. Soncin and N. Wernert (2005). "Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth." Oncogene **24**(34): 5384-8.

Hakansson, A., B. Gustafsson, A. Abdiu, L. Krysander and L. Hakansson (2003). "Bcl-2 expression in metastatic malignant melanoma. Importance for the therapeutic efficacy of biochemotherapy." Cancer Immunol Immunother **52**(4): 249-54.

Hall, A. G. (1999). "Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis." Eur J Clin Invest **29**(3): 238-45.

Halliwell, B. (2007). "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" Biochem J **401**(1): 1-11.

Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." FEBS Lett **281**(1-2): 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**(6): 598-620.

Hamilton, K. L., J. C. Quindry, J. P. French, J. Staib, J. Hughes, J. L. Mehta and S. K. Powers (2004). "MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias." Free Radic Biol Med **37**(9): 1360-8.

Hammond, C. L., R. Marchan, S. M. Krance and N. Ballatori (2007). "Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins." J Biol Chem **282**(19): 14337-47.

Han, D., N. Hanawa, B. Saberi and N. Kaplowitz (2006a). "Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis." Free Radic Biol Med **41**(4): 627-39.

Han, L., J. Hiratake, N. Tachi, H. Suzuki, H. Kumagai and K. Sakata (2006b). "Gamma-(monophenyl)phosphono glutamate analogues as mechanism-based inhibitors of gamma-glutamyl transpeptidase." Bioorg Med Chem **14**(17): 6043-54.

Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

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**(2): 181-5.

Hanigan, M. H. (1998). "gamma-Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: its expression and function in carcinogenesis." Chem Biol Interact **111-112**: 333-42.

Hansen, J. F. and K. Mellempgaard (1999). "Angina pectoris, myocardial infarction and verapamil." J Am Coll Cardiol **34**(3): 957-8.

Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). "The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms." Genes Dev **14**(19): 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**(6): 859-69.

Harju, T., R. Kaarteenaho-Wiik, R. Sirvio, P. Paakko, J. D. Crapo, T. D. Oury, Y. Soini and V. L. Kinnula (2004). "Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs." Eur Respir J **24**(5): 765-71.

Harley, C. B. (1994). "Telomerases." Pathol Biol (Paris) **42**(4): 342-5.

Harrington, L. (2004). "Does the reservoir for self-renewal stem from the ends?" Oncogene **23**(43): 7283-9.

Hart, I. R. and I. J. Fidler (1980). "Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma." Cancer Res **40**(7): 2281-7.

Hayashida, Y., K. Honda, M. Idogawa, Y. Ino, M. Ono, A. Tsuchida, T. Aoki, S. Hirohashi and T. Yamada (2005). "E-cadherin regulates the association between beta-catenin and actinin-4." Cancer Res **65**(19): 8836-45.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

Hernandez-Barrantes, S., M. Bernardo, M. Toth and R. Fridman (2002). "Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases." Semin Cancer Biol **12**(2): 131-8.

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**(1): 87-94.

Hidalgo, M., G. Rodriguez, J. G. Kuhn, T. Brown, G. Weiss, J. P. MacGovren, D. D. Von Hoff and E. K. Rowinsky (1998). "A Phase I and pharmacological study of the glutamine antagonist acivicin with the amino acid solution aminosyn in patients with advanced solid malignancies." Clin Cancer Res **4**(11): 2763-70.

Hilgendorf, C., G. Ahlin, A. Seithel, P. Artursson, A. L. Ungell and J. E. Karlsson (2007). "Expression of 36 drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines." Drug Metab Dispos.

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**(12): 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**(23): 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.

Holmgren, L., M. S. O'Reilly and J. Folkman (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-53.

Honn, K. V., D. G. Tang and J. D. Crissman (1992). "Platelets and cancer metastasis: a causal relationship?" Cancer Metastasis Rev **11**(3-4): 325-51.

Horiuchi, S., M. Inoue and Y. Morino (1978). "Gamma-glutamyl transpeptidase: sidedness of its active site on renal brush-border membrane." Eur J Biochem **87**(3): 429-37.

Hornebeck, W., H. Emonard, J. C. Monboisse and G. Bellon (2002). "Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression." Semin Cancer Biol **12**(3): 231-41.

Hornebeck, W. and F. X. Maquart (2003). "Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 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." Genes Chromosomes Cancer **15**(2): 95-101.

Houghton, J., A. Morozov, I. Smirnova and T. C. Wang (2007). "Stem cells and cancer." Semin Cancer Biol **17**(3): 191-203.

Houle, F. and J. Huot (2006). "Dysregulation of the endothelial cellular response to oxidative stress in cancer." Mol Carcinog **45**(6): 362-7.

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**(6317): 427-8.

Huang, P., L. Feng, E. A. Oldham, M. J. Keating and W. Plunkett (2000). "Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells." Nature **407**(6802): 390-5.

Hurtado, M., J. J. Lozano, E. Castellanos, L. A. Lopez-Fernandez, K. Harshman, A. C. Martinez, A. R. Ortiz, T. M. Thomson and R. Paciucci (2007). "Activation of the epidermal growth factor signaling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells." Gut.

Ibiza, S., V. M. Victor, I. Bosca, A. Ortega, A. Urzainqui, J. E. O'Connor, F. Sanchez-Madrid, J. V. Esplugues and J. M. Serrador (2006). "Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse." Immunity **24**(6): 753-65.

Inbal, B., O. Cohen, S. Polak-Charcon, J. Kopolovic, E. Vadai, L. Eisenbach and A. Kimchi (1997). "DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis." Nature **390**(6656): 180-4.

Indo, H. P., M. Davidson, H. C. Yen, S. Suenaga, K. Tomita, T. Nishii, M. Higuchi, Y. Koga, T. Ozawa and H. J. Majima (2007). "Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage." Mitochondrion **7**(1-2): 106-18.

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.

Iwanaga, Y., Y. H. Chi, A. Miyazato, S. Sheleg, K. Haller, J. M. Peloponese, Jr., Y. Li, J. M. Ward, R. Benezra and K. T. Jeang (2007). "Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice." Cancer Res **67**(1): 160-6.

Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-93.

Jakobisiak, M., W. Lasek and J. Golab (2003). "Natural mechanisms protecting against cancer." Immunol Lett **90**(2-3): 103-22.

Jang, J. H. and Y. J. Surh (2003). "Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function." Biochem Pharmacol **66**(8): 1371-9.

Jedlitschky, G., I. Leier, U. Buchholz, J. Hummel-Eisenbeiss, B. Burchell and D. Keppler (1997). "ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2." Biochem J **327** (Pt 1): 305-10.

Jennings, R. B. and K. A. Reimer (1981). "Lethal myocardial ischemic injury." Am J Pathol **102**(2): 241-55.

Jones, T. W., H. Thor and S. Orrenius (1986). "Cellular defense mechanisms against toxic substances." Arch Toxicol Suppl **9**: 259-71.

Jou, T. S., D. B. Stewart, J. Stappert, W. J. Nelson and J. A. Marrs (1995). "Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5067-71.

Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.

Jumper, C., E. Cobos and C. Lox (2004). "Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment." Respir Med **98**(2): 173-7.

Jungas, T., I. Motta, F. Duffieux, P. Fanen, V. Stoven and D. M. Ojcius (2002). "Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." J Biol Chem **277**(31): 27912-8.

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." Science **262**(5137): 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**(11): 1849-51.

Katoch, B., S. Sebastian, S. Sahdev, H. Padh, S. E. Hasnain and R. Begum (2002). "Programmed cell death and its clinical implications." Indian J Exp Biol **40**(5): 513-24.

Kattan, Z., V. Minig, P. Leroy, M. Dauca and P. Becuwe (2007). "Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat.

Kaufmann, Y., J. Kornbluth, Z. Feng, M. Fahr, R. F. Schaefer and V. S. Klimberg (2003). "Effect of glutamine on the initiation and promotion phases of DMBA-induced mammary tumor development." JPEN J Parenter Enteral Nutr **27**(6): 411-8.

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**(4): 239-57.

Kim, C. H., S. K. Moon, J. H. Bae, J. H. Lee, J. H. Han, K. Kim and E. C. Choi (2006). "Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma." Acta Otolaryngol **126**(1): 88-94.

Kim, N. W., M. A. 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**(5193): 2011-5.

Kim, Y. M., K. Son, S. J. Hong, A. Green, J. J. Chen, E. Tzeng, C. Hierholzer and T. R. Billiar (1998). "Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha." Mol Med **4**(3): 179-90.

Kimura, A. K. and J. H. Xiang (1986). "High levels of Met-72 antigen expression: correlation with metastatic activity of B16 melanoma tumor cell variants." J Natl Cancer Inst **76**(6): 1247-54.

Kinnula, V. L. and J. D. Crapo (2004). "Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors." Free Radic Biol Med **36**(6): 718-44.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1998). "Landscaping the cancer terrain." Science **280**(5366): 1036-7.

Klatt, P. and S. Lamas (2000). "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress." Eur J Biochem **267**(16): 4928-44.

Klaunig, J. E. and L. M. Kamendulis (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 239-67.

Kleer, C. G., K. L. van Golen, T. Braun and S. D. Merajver (2001). "Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer." Mod Pathol **14**(5): 458-64.

Klemke, M., T. Weschenfelder, M. H. Konstandin and Y. Samstag (2007). "High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers." J Cell Physiol.

Klimberg, V. S., J. Kornbluth, Y. Cao, A. Dang, S. Blossom and R. F. Schaeffer (1996). "Glutamine suppresses PGE2 synthesis and breast cancer growth." J Surg Res **63**(1): 293-7.

Klimberg, V. S., E. Nwokedi, L. F. Hutchins, A. A. Pappas, N. P. Lang, J. R. Broadwater, R. C. Read and K. C. Westbrook (1992a). "Glutamine facilitates chemotherapy while reducing toxicity." JPEN J Parenter Enteral Nutr **16**(6 Suppl): 83S-87S.

Klimberg, V. S., A. A. Pappas, E. Nwokedi, J. C. Jensen, J. R. Broadwater, N. P. Lang and K. C. Westbrook (1992b). "Effect of supplemental dietary glutamine on methotrexate concentrations in tumors." Arch Surg **127**(11): 1317-20.

Klug, W. S. and M. R. Cummings (1999). Conceptos de genética. S. R. L. Prentice Hall Iberia. 5ª edición

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." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): 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**(4): 820-3.

Kogan, I., M. Ramjeesingh, C. Li, J. F. Kidd, Y. Wang, E. M. Leslie, S. P. Cole and C. E. Bear (2003). "CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux." Embo J **22**(9): 1981-9.

Koshelnick, Y., M. Ehart, P. Hufnagl, P. C. Heinrich and B. R. Binder (1997). "Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598." J Biol Chem **272**(45): 28563-7.

Kovacevic, Z. (1971). "The pathway of glutamine and glutamate oxidation in isolated mitochondria from mammalian cells." Biochem J **125**(3): 757-63.

Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat Med **6**(5): 513-9.

Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan and C. Gelinas (2003). "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." Oncogene **22**(56): 8961-82.

Kufe, D. W., R. E. Pollock, Weichselbaum, B. R.R., R.C., , T. S. Gansler and J. F. Holland (2003). Cancer Medicine. E. Frei III, editors. 6th ed

Kunigal, S., C. S. Gondi, M. Gujrati, S. S. Lakka, D. H. Dinh, W. C. Olivero and J. S. Rao (2006). "SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA." Int J Oncol **29**(6): 1349-57.

Kuranaga, E. and M. Miura (2007). "Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination." Trends Cell Biol **17**(3): 135-44.

Laberge, R. M., J. Karwatsky, M. C. Lincoln, M. L. Leimanis and E. Georges (2007). "Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress." Biochem Pharmacol **73**(11): 1727-37.

Laferriere, J., F. Houle and J. Huot (2002). "Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38." Ann N Y Acad Sci **973**: 562-72.

Lafrenie, R., S. G. Shaughnessy and F. W. Orr (1992). "Cancer cell interactions with injured or activated endothelium." Cancer Metastasis Rev **11**(3-4): 377-88.

Lai, J. C., L. Benimetskaya, A. Khvorova, S. Wu, E. Hua, P. Miller and C. A. Stein (2005). "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides and G3139 induce apoptosis in 518A2 melanoma cells." Mol Cancer Ther **4**(2): 305-15.

Lai, L. and T. M. Tan (2002). "Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues." Biochem J **361**(Pt 3): 497-503.

Lamprecht, W. and I. Trautschold (1974). Determination with Hexokinase and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase 2nd edition

Lancaster, J. R., Jr., S. M. Laster and L. R. Gooding (1989). "Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor." FEBS Lett **248**(1-2): 169-74.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.

Larsson, R. and P. Cerutti (1988). "Oxidants induce phosphorylation of ribosomal protein S6." J Biol Chem **263**(33): 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**(20): 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**(4): 549-56.

Lasky, L. A. (1992). "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation." Science **258**(5084): 964-9.

Lawrence, R. A. and R. F. Burk (1976). "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." Biochem Biophys Res Commun **71**(4): 952-8.

Lazo, P. A. (1981). "Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells." Eur J Biochem **117**(1): 19-25.

Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006).

"Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." *Aging Cell* **5**(2): 187-95.

Lee, K., A. J. Klein-Szanto and G. D. Kruh (2000). "Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells." *J Natl Cancer Inst* **92**(23): 1934-40.

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." *Free Radic Biol Med* **31**(12): 1550-9.

Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 589-98.

Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.

Lennon, S. L., J. C. Quindry, K. L. Hamilton, J. P. French, J. Hughes, J. L. Mehta and S. K. Powers (2004). "Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(2): H975-80.

Li, H., Z. M. Marshall and A. R. Whorton (1999). "Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels." *Am J Physiol* **276**(4 Pt 1): C803-11.

Li, L. Y., X. Luo and X. Wang (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-9.

Li, Y., Q. Chang, B. P. Rubin, C. D. Fletcher, T. W. Morgan, S. J. Mentzer, D. J. Sugarbaker, J. A. Fletcher and S. Xiao (2007). "Insulin receptor activation in solitary fibrous tumours." J Pathol **211**(5): 550-4.

Liebermann, D. A., B. Hoffman and R. A. Steinman (1995). "Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways." Oncogene **11**(1): 199-210.

Lin, R. X., Z. Y. Wang, N. Zhang, C. W. Tuo, Q. D. Liang, Y. N. Sun and S. Q. Wang (2007). "Inhibition of hepatocellular carcinoma growth by antisense oligonucleotides to type I insulin-like growth factor receptor in vitro and in an orthotopic model." Hepatol Res **37**(5): 366-75.

Linder-Horowitz, M., W. E. Knox and H. P. Morris (1969). "Glutaminase activities and growth rates of rat hepatomas." Cancer Res **29**(6): 1195-9.

Linsdell, P. and J. W. Hanrahan (1998). "Glutathione permeability of CFTR." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C323-6.

Liotta, L. A., J. Kleinerman and G. M. Sidel (1974). "Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation." Cancer Res **34**(5): 997-1004.

Liotta, L. A., C. N. Rao and S. H. Barsky (1983). "Tumor invasion and the extracellular matrix." Lab Invest **49**(6): 636-49.

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**(2): 327-36.

Liotta, L. A., D. Vembu, R. K. Saini and C. Boone (1978). "In vivo monitoring of the death rate of artificial murine pulmonary micrometastases." Cancer Res **38**(5): 1231-6.

Lissoni, P., S. Pittalis, A. Ardizzoia, F. Brivio, S. Barni, G. Tancini, F. Pelizzoni, G. J. Maestroni, B. Zubelewicz and R. Braczkowski (1996). "Prevention of cytokine-induced hypotension in cancer patients by the pineal hormone melatonin." Support Care Cancer **4**(4): 313-6.

Liu, X. M., K. J. Peyton, D. Ensenat, H. Wang, M. Hannink, J. Alam and W. Durante (2007). "Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival." Cardiovasc Res.

Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel and M. Karin (1996). "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death." Cell **87**(3): 565-76.

Liu, Z. Q. and H. Y. Shan (2006). "Cholesterol, not polyunsaturated fatty acids, is target molecule in oxidation induced by reactive oxygen species in membrane of human erythrocytes." Cell Biochem Biophys **45**(2): 185-93.

Loeb, L. A. (1985). "Apurinic sites as mutagenic intermediates." Cell **40**(3): 483-4.

Lowe, S. W. and C. J. Sherr (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 77-83.

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**(4): 1191-8.

Lundblad, V. and J. W. Szostak (1989). "A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast." Cell **57**(4): 633-43.

Mackay, C. R. and B. A. Imhof (1993). "Cell adhesion in the immune system." Immunol Today **14**(3): 99-102.

Macleod, K. (2000). "Tumor suppressor genes." Curr Opin Genet Dev **10**(1): 81-93.

Mancuso, C., G. Pani and V. Calabrese (2006). "Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species." Redox Rep **11**(5): 207-13.

Marchal, J. A., F. Rodriguez-Serrano, J. Campos, R. Madeddu, H. Boulaiz, A. Martinez-Amat, E. Carrillo, O. Caba, J. C. Prados, C. Velez, C. Melguizo, A. Montella and A. Aranega (2006). "Differentiation: an encouraging approach to anticancer therapy." Ital J Anat Embryol **111**(1): 45-64.

Mareel, M. and I. Madani (2006). "Tumour-associated host cells participating at invasion and metastasis : targets for therapy?" Acta Chir Belg **106**(6): 635-40.

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**(5): 813-9.

Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." Mutat Res **424**(1-2): 83-95.

Martensson, J., J. C. Lai and A. Meister (1990). "High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 7185-9.

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**(8): 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**(4): 1866-74.

Mayer, B. and B. Hemmens (1997). "Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells." Trends Biochem Sci **22**(12): 477-81.

Mazumdar, M., J. H. Lee, K. Sengupta, T. Ried, S. Rane and T. Misteli (2006). "Tumor formation via loss of a molecular motor protein." Curr Biol **16**(15): 1559-64.

McCawley, L. J., H. C. Crawford, L. E. King, Jr., J. Mudgett and L. M. Matrisian (2004). "A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma." Cancer Res **64**(19): 6965-72.

McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen." J Biol Chem **244**(22): 6056-63.

McDonald, D. M. and P. Baluk (2002). "Significance of blood vessel leakiness in cancer." Cancer Res **62**(18): 5381-5.

McDonald, R. A., R. P. Matthews, R. L. Idzerda and G. S. McKnight (1995). "Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7560-4.

Mehlen, P. and A. Puisieux (2006). "Metastasis: a question of life or death." Nat Rev Cancer **6**(6): 449-58.

Meier, P., A. Finch and G. Evan (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.

Meister, A. (1983). "Selective modification of glutathione metabolism." Science **220**(4596): 472-7.

Meister, A. (1991). "Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy." Pharmacol Ther **51**(2): 155-94.

Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52**: 711-60.

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." Exp Neurol **158**(2): 428-36.

Messerli, F. H. (2002). "Calcium antagonists in hypertension: from hemodynamics to outcomes." Am J Hypertens **15**(7 Pt 2): 94S-97S.

Messmer, U. K. and B. Brune (1996). "Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD⁺ content, and p53 accumulation." Arch Biochem Biophys **327**(1): 1-10.

Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2005). "BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." Nature **436**(7051): 720-4.

Michel, T. and O. Feron (1997). "Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?" J Clin Invest **100**(9): 2146-52.

Mignatti, P. and D. B. Rifkin (1993). "Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion." Physiol Rev **73**(1): 161-95.

Modi, S. and D. M. Lowder (2006). "Medications for migraine prophylaxis." Am Fam Physician **73**(1): 72-8.

Mooi, W. J. and D. S. Peeper (2006). "Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer." N Engl J Med **355**(10): 1037-46.

Moriya, R., T. Uehara and Y. Nomura (2000). "Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." FEBS Lett **484**(3): 253-60.

Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.

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." J Biol Chem **279**(26): 27494-501.

Naya, M., Y. Mataka, H. Takahira, T. Deguchi and M. Yasuda (1990). "Effects of phorone and/or buthionine sulfoximine on teratogenicity of 5-fluorouracil in mice." Teratology **41**(3): 275-80.

Ngan, C. Y., H. Yamamoto, I. Seshimo, K. Ezumi, M. Terayama, H. Hemmi, I. Takemasa, M. Ikeda, M. Sekimoto and M. Monden (2007). "A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer." J Surg Oncol.

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**(2): 143-88.

Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." Oncogene **23**(16): 2757-65.

Nordling, C. O. (1953). "A new theory on cancer-inducing mechanism." Br J Cancer **7**(1): 68-72.

Nyaga, S. G., A. Lohani, P. Jaruga, A. R. Trzeciak, M. Dizdaroglu and M. K. Evans (2006). "Reduced repair of 8-hydroxyguanine in the human breast cancer cell line, HCC1937." BMC Cancer **6**: 297.

O'Brien, S., J. O. Moore, T. E. Boyd, L. M. Larratt, A. Skotnicki, B. Koziner, A. A. Chanan-Khan, J. F. Seymour, R. G. Bociek, S. Pavletic and K. R. Rai (2007). "Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia." J Clin Oncol **25**(9): 1114-20.

Obrador, E., J. Carretero, J. M. Esteve, J. A. Pellicer, A. Pascual, I. Petschen and J. M. Estrela (2001). "Glutamine potentiates TNF-alpha-induced tumor cytotoxicity." Free Radic Biol Med **31**(5): 642-50.

Obrador, E., J. Carretero, A. Ortega, I. Medina, V. Rodilla, J. A. Pellicer and J. M. Estrela (2002). "gamma-Glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver." Hepatology **35**(1): 74-81.

Obrador, E., J. Navarro, J. Mompou, M. Asensi, J. A. Pellicer and J. M. Estrela (1997). "Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo." Biochem J **325 (Pt 1)**: 183-9.

Oguz, M., M. Kerem, A. Bedirli, B. B. Menten, O. Sakrak, B. Salman and H. Bostanci (2007). "L-Alanine-L-glutamine supplementation improves the outcome after colorectal surgery for cancer." Colorectal Dis **9**(6): 515-20.

Ohsawa, I., M. Ishikawa, K. Takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. I. Katsura, Y. Katayama, S. Asoh and S. Ohta (2007). "Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals." Nat Med.

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**(12): 3233-6.

Okegawa, T., R. C. Pong, Y. Li and J. T. Hsieh (2004). "The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy." Acta Biochim Pol **51**(2): 445-57.

Oldham, R. K. (1986). "Biotherapy: the fourth modality of cancer treatment." J Cell Physiol Suppl **4**: 91-9.

Olszewska-Slonina, D., T. Drewa, J. Styczynski, K. Olszewski and D. Musialkiewicz (2004). "B16 and CLS91 mouse melanoma cells susceptibility to apoptosis after vincristin treatment in vitro." Acta Pol Pharm **61**(2): 113-21.

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**(6): 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**(3): 310-29.

Ortega, A., P. Ferrer, J. Carretero, E. Obrador, M. Asensi, J. A. Pellicer and J. M. Estrela (2003a). "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**(41): 39591-9.

Ortega, A. L., J. Carretero, E. Obrador, J. Gambini, M. Asensi, V. Rodilla and J. M. Estrela (2003b). "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**(16): 13888-97.

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**(6): 1203-11.

Oyarzo, M. P., L. J. Medeiros, C. Atwell, M. Feretzaki, V. Leventaki, E. Drakos, H. M. Amin and G. Z. Rassidakis (2006). "c-FLIP confers resistance to FAS-mediated apoptosis in anaplastic large-cell lymphoma." Blood **107**(6): 2544-7.

Ozawa, M., M. Ringwald and R. Kemler (1990). "Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4246-50.

Ozols, R. F., R. E. Cunnion, R. W. Klecker, Jr., T. C. Hamilton, Y. Ostchega, J. E. Parrillo and R. C. Young (1987). "Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients." J Clin Oncol **5**(4): 641-7.

Pajares, M. A., C. Duran, F. Corrales, M. M. Pliego and J. M. Mato (1992). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." J Biol Chem **267**(25): 17598-605.

Pani, G., R. Colavitti, B. Bedogni, S. Fusco, D. Ferraro, S. Borrello and T. Galeotti (2004). "Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies." Curr Med Chem **11**(10): 1299-308.

Papadopoulos, M. C., I. L. Koumenis, L. Xu and R. G. Giffard (1998). "Potentiation of murine astrocyte antioxidant defence by bcl-2: protection in part reflects elevated glutathione levels." Eur J Neurosci **10**(4): 1252-60.

Papetti, M. and I. M. Herman (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **282**(5): C947-70.

Pardee, A. B. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation." Science **246**(4930): 603-8.

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**(3): 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**(4): 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**(1): 257-64.

Pieper, A. A., A. Verma, J. Zhang and S. H. Snyder (1999). "Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death." Trends Pharmacol Sci **20**(4): 171-81.

Pierce, G. B. (1974). "Neoplasms, differentiations and mutations." Am J Pathol **77**(1): 103-118.

Plow, E. F. and L. A. Miles (1990). "Plasminogen receptors in the mediation of pericellular proteolysis." Cell Differ Dev **32**(3): 293-8.

Polsky, D. and C. Cordon-Cardo (2003). "Oncogenes in melanoma." Oncogene **22**(20): 3087-91.

Potter, V. R. (1978). "Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture." Br J Cancer **38**(1): 1-23.

Prescott, S. M. (1999). "A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers." J Biol Chem **274**(33): 22901.

Pryor, W. A. and G. L. Squadrito (1995). "The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): L699-722.

Quaranta, V. (2000). "Cell migration through extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way." J Cell Biol **149**(6): 1167-70.

Raderer, M. and W. Scheithauer (1993). "Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. A literature review." Cancer **72**(12): 3553-63.

Rak, J. and J. L. Yu (2004). "Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"." Semin Cancer Biol **14**(2): 93-104.

Rather, L. J. (1978). "The genesis of cancer: a study in the history of ideas. ." The Johns Hopkins University Press: 1-178.

Raud, J. and L. Lindbom (1993). "Leukocyte rolling and firm adhesion in the microcirculation." Gastroenterology **104**(1): 310-4.

Red-Horse, K., Y. Crawford, F. Shojaei and N. Ferrara (2007). "Endothelium-microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult." Dev Cell **12**(2): 181-94.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.

Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-5.

Rice, G. E. and M. P. Bevilacqua (1989). "An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion." Science **246**(4935): 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**(2): 204-10.

Rich, T., R. L. Allen and A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.

Richman, P. G. and A. Meister (1975). "Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione." J Biol Chem **250**(4): 1422-6.

Ridnour, L. A., D. D. Thomas, D. Mancardi, M. G. Espey, K. M. Miranda, N. Paolucci, M. Feelisch, J. Fukuto and D. A. Wink (2004). "The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations." Biol Chem **385**(1): 1-10.

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." Mutat Res **497**(1-2): 153-7.

Rius, M., A. T. Nies, J. Hummel-Eisenbeiss, G. Jedlitschky and D. Keppler (2003). "Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane." Hepatology **38**(2): 374-84.

Rodrigo, J., D. Alonso, A. Fernandez, J. Serrano and J. Lopez (2000). "[Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity]." An Sist Sanit Navar **23**(2): 195-235.

Rodríguez-Fragoso, L., F. R. Jurado-León and J. A. Reyes-Esparza (2000). "La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral." Rev Inst Nal Cancerol (Mex). **46**: 33-46.

Rosi, A., S. Grande, A. M. Luciani, A. Palma, C. Giovannini, L. Guidoni, O. Saporá and V. Viti (2007). "Role of glutathione in apoptosis induced by radiation as determined by ¹H MR spectra of cultured tumor cells." Radiat Res **167**(3): 268-82.

Ross, D. D., W. Yang, L. V. Abruzzo, W. S. Dalton, E. Schneider, H. Lage, M. Dietel, L. Greenberger, S. P. Cole and L. A. Doyle (1999). "Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines." J Natl Cancer Inst **91**(5): 429-33.

Rouse, K., E. Nwokedi, J. E. Woodliff, J. Epstein and V. S. Klimberg (1995). "Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism." Ann Surg **221**(4): 420-6.

Ruoso, P. and D. W. Hedley (2004). "Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase activity decreases intracellular cysteine levels in cervical carcinoma." Cancer Chemother Pharmacol **54**(1): 49-56.

Sachdev, D. and D. Yee (2007). "Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy." Mol Cancer Ther **6**(1): 1-12.

Sahney, S. (2006). "A review of calcium channel antagonists in the treatment of pediatric hypertension." Paediatr Drugs **8**(6): 357-73.

Sakahira, H., M. Enari and S. Nagata (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." Nature **391**(6662): 96-9.

Sakakura, Y., H. Sato, A. Shiiya, M. Tamba, J. Sagara, M. Matsuda, N. Okamura, N. Makino and S. Bannai (2007). "Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils." J Leukoc Biol **81**(4): 974-82.

Salerno, M., P. Loechariyakul, C. Saengkhae and A. Garnier-Suillerot (2004). "Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRPI-mediated efflux of daunorubicin." Biochem Pharmacol **68**(11): 2159-65.

Sander, C. S., F. Hamm, P. Elsner and J. J. Thiele (2003). "Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer." Br J Dermatol **148**(5): 913-22.

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**(4419): 700-2.

Schneppenheim, R., U. Budde, N. Dahlmann and P. Rautenberg (1991). "Luminography--a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis." Electrophoresis **12**(5): 367-72.

Schopfer, F., N. Riobo, M. C. Carreras, B. Alvarez, R. Radi, A. Boveris, E. Cadenas and J. J. Poderoso (2000). "Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage." Biochem J **349**(Pt 1): 35-42.

Schuetz, E. G., S. Strom, K. Yasuda, V. Lecureur, M. Assem, C. Brimer, J. Lamba, R. B. Kim, V. Ramachandran, B. J. Komoroski, R. Venkataramanan, H. Cai, C. J. Sinal, F. J. Gonzalez and J. D.

Schuetz (2001). "Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450." J Biol Chem **276**(42): 39411-8.

Schuetz, J. D., M. C. Connelly, D. Sun, S. G. Paibir, P. M. Flynn, R. V. Srinivas, A. Kumar and A. Fridland (1999). "MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs." Nat Med **5**(9): 1048-51.

Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-66.

Seiki, M. (2002). "The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 624-32.

Sellak, H., E. Franzini, J. Hakim and C. Pasquier (1994). "Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation." Blood **83**(9): 2669-77.

Seth, A. and D. K. Watson (2005). "ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer." Eur J Cancer **41**(16): 2462-78.

Shay, J. W. and I. B. Roninson (2004). "Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy." Oncogene **23**(16): 2919-33.

Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 731-7.

Sherwood, D. R. (2006). "Cell invasion through basement membranes: an anchor of understanding." Trends Cell Biol **16**(5): 250-6.

Siddiqui, R., D. Pandya, K. Harvey and G. P. Zaloga (2006). "Nutrition modulation of cachexia/proteolysis." Nutr Clin Pract **21**(2): 155-67.

Sidenius, N. and F. Blasi (2003). "The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy." Cancer Metastasis Rev **22**(2-3): 205-22.

Sies, H. (1991). "Oxidative stress: from basic research to clinical application." Am J Med **91**(3C): 31S-38S.

Skipworth, R. J., G. D. Stewart, C. H. Dejong, T. Preston and K. C. Fearon (2007). "Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumour interaction?" Clin Nutr.

Slater, A. F., C. Stefan, I. Nobel, D. J. van den Dobbelen and S. Orrenius (1995). "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis." Toxicol Lett **82-83**: 149-53.

Sloane, B. F., M. Sameni, I. Podgorski, D. Cavallo-Medved and K. Moin (2006). "Functional imaging of tumor proteolysis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 301-15.

Smith, C. A., T. Farrah and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-62.

Starz-Gaiano, M. and D. J. Montell (2004). "Genes that drive invasion and migration in *Drosophila*." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 86-91.

Stein, R. L., C. DeCicco, D. Nelson and B. Thomas (2001). "Slow-binding inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase by gamma-boroGlu." Biochemistry **40**(19): 5804-11.

Steinberg, D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance." J Biol Chem **272**(34): 20963-6.

Steinman, H. M. (1995). "The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant." J Biol Chem **270**(8): 3487-90.

Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (1998). "Properties of the caspases." Biochim Biophys Acta **1387**(1-2): 17-31.

Stole, E., A. P. Seddon, D. Wellner and A. Meister (1990). "Identification of a highly reactive threonine residue at the active site of gamma-glutamyl transpeptidase." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1706-9.

Stole, E., T. K. Smith, J. M. Manning and A. Meister (1994). "Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with acivicin." J Biol Chem **269**(34): 21435-9.

Stoolman, L. M. (1989). "Adhesion molecules controlling lymphocyte migration." Cell **56**(6): 907-10.

Storey, B. (2007). "The role of oral glutamine in pediatric bone marrow transplant." J Pediatr Oncol Nurs **24**(1): 41-5.

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**(4): 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**(1): 11-21.

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**(6): 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.

Sullivan, R. and C. H. Graham (2007). "Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype." Cancer Metastasis Rev.

Surapaneni, K. M. and G. R. Venkata (2006). "Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with carcinoma of prostate." Indian J Physiol Pharmacol **50**(4): 350-4.

Syrigos, K. N. and A. J. Karayiannakis (2006). "Adhesion molecules as targets for the treatment of neoplastic diseases." Curr Pharm Des **12**(22): 2849-61.

Szende, B., G. Keri, Z. Szegedi, I. Benedeczky, A. Csikos, L. Orfi and A. Gazit (1995). "Tyrphostin induces non-apoptotic programmed cell death in colon tumor cells." Cell Biol Int **19**(11): 903-11.

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**(4929): 491-4.

Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 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." Eur J Cancer **35**(2): 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**(4): 875-81.

Tassone, P., P. Tagliaferri, M. T. Fulciniti, M. T. Di Martino and S. Venuta (2007). "Novel therapeutic approaches based on the targeting of microenvironment-derived survival pathways in human cancer: experimental models and translational issues." Curr Pharm Des **13**(5): 487-96.

Tate, S. S. and A. Meister (1978). "Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4806-9.

Tateishi, N., T. Higashi, A. Naruse, K. Nakashima and H. Shiozaki (1977). "Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine." J Nutr **107**(1): 51-60.

Tateishi, N., T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse and Y. Sakamoto (1974). "Studies on the regulation of glutathione level in rat liver." J Biochem (Tokyo) **75**(1): 93-103.

Tatoyan, A. and C. Giulivi (1998). "Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 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.

Theiss, A. L., J. G. Simmons, C. Jobin and P. K. Lund (2005). "Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2." J Biol Chem **280**(43): 36099-109.

Tien, M., B. S. Berlett, R. L. Levine, P. B. Chock and E. R. Stadtman (1999). "Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7809-14.

Todorova, V. K., S. A. Harms, Y. Kaufmann, S. Luo, K. Q. Luo, K. Babb and V. S. Klimberg (2004). "Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis-related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats." Breast Cancer Res Treat **88**(3): 247-56.

Toffoli, G., G. Corona, M. Gigante and M. Boiocchi (1996). "Inhibition of Pgp activity and cell cycle-dependent chemosensitivity to doxorubicin in the multidrug-resistant LoVo human colon cancer cell line." Eur J Cancer **32A**(9): 1591-7.

Tonks, N. K. (1993). "Introduction: protein tyrosine phosphatases." Semin Cell Biol **4**(6): 373-7.

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**(3): 453-82.

Tsuruo, T., H. Iida, S. Tsukagoshi and Y. Sakurai (1981). "Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil." Cancer Res **41**(5): 1967-72.

Ugurel, S., D. Schadendorf, C. Pfohler, K. Neuber, A. Thielke, J. Ulrich, A. Hauschild, K. Spieth, M. Kaatz, W. Rittgen, S. Delorme, W. Tilgen and U. Reinhold (2006). "In vitro drug sensitivity predicts response and survival after individualized sensitivity-directed chemotherapy in metastatic melanoma: a multicenter phase II trial of the Dermatologic Cooperative Oncology Group." Clin Cancer Res **12**(18): 5454-63.

Um, J. H., J. K. Kwon, C. D. Kang, M. J. Kim, D. S. Ju, J. H. Bae, D. W. Kim, B. S. Chung and S. H. Kim (2004). "Relationship between antiapoptotic molecules and metastatic potency and the involvement of DNA-dependent protein kinase in the chemosensitization of metastatic human cancer cells by epidermal growth factor receptor blockade." J Pharmacol Exp Ther **311**(3): 1062-70.

Vahrmeijer, A. L., R. W. Hoetelmans, G. J. Mulder, J. Schutrups, R. L. van Vlierberghe, C. J. van de Velde and J. H. van Dierendonck (2000). "Development of resistance to glutathione depletion-induced cell death in CC531 colon carcinoma cells: association with increased expression of bcl-2." Biochem Pharmacol **59**(12): 1557-62.

Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach and P. E. Lipsky (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells." Blood **108**(1): 253-61.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

van Puijenbroek, M., M. Nielsen, T. H. Reinards, M. M. Weiss, A. Wagner, Y. M. Hendriks, H. F. Vasen, C. M. Tops, J. Wijnen, T. van Wezel, F. J. Hes and H. Morreau (2006). "The natural history of a combined defect in MSH6 and MUTYH in a HNPCC family." Fam Cancer.

Vanstapel, M. J., K. C. Gatter, C. de Wolf-Peeters, D. Y. Mason and V. D. Desmet (1986). "New sites of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies." Am J Clin Pathol **85**(2): 160-8.

Varani, J., W. Orr and P. A. Ward (1980). "Adhesive characteristics of tumor cell variants of high and low tumorigenic potential." J Natl Cancer Inst **64**(5): 1173-8.

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**(9): 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**(1): 43-53.

Vidal-Vanaclocha, F., M. Rocha, A. Asumendi and E. Barbera-Guillem (1993). "Isolation and enrichment of two sublobular compartment-specific endothelial cell subpopulations from liver sinusoids." Hepatology **18**(2): 328-39.

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**(1): 107-19.

Voehringer, D. W. and R. E. Meyn (2000). "Redox aspects of Bcl-2 function." Antioxid Redox Signal **2**(3): 537-50.

Voura, E. B., M. Sandig and C. H. Siu (1998). "Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells." Microsc Res Tech **43**(3): 265-75.

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.

Wang, H., Z. Wang, J. Chen and J. Wu (2007). "Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF-kappaB, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes." Cell Biol Int.

Watnick, R. S., Y. N. Cheng, A. Rangarajan, T. A. Ince and R. A. Weinberg (2003). "Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis." Cancer Cell **3**(3): 219-31.

Weigelt, B., J. L. Peterse and L. J. van 't Veer (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer **5**(8): 591-602.

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**(3-4): 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**(17): 5737-41.

Wilson, L. A., A. Gemin, R. Espiritu and G. Singh (2005). "ets-1 is transcriptionally up-regulated by H₂O₂ via an antioxidant response element." Faseb J **19**(14): 2085-7.

Williamson, G., I. Aeberli, L. Miguët, Z. Zhang, M. B. Sanchez, V. Crespy, D. Barron, P. Needs, P. A. Kroon, H. Glavinas, P. Krajcsi and M. Grigorov (2007). "Interaction of Positional Isomers of Quercetin Glucuronides with the Transporter Abcc2 (Cmoat, Mrp2)." Drug Metab Dispos.

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.

Wojciak-Stothard, B. and A. J. Ridley (2002). "Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability." Vascul Pharmacol **39**(4-5): 187-99.

Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui and L. A. Liotta (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8 Suppl): 1529-37.

Wyllie, A. H., G. J. Beattie and A. D. Hargreaves (1981). "Chromatin changes in apoptosis." Histochem J **13**(4): 681-92.

Xu, W., L. Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed and I. G. Charles (2002). "The role of nitric oxide in cancer." Cell Res **12**(5-6): 311-20.

Yabuki, M., K. Tsutsui, A. A. Horton, T. Yoshioka and K. Utsumi (2000). "Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor." Free Radic Res **32**(6): 507-14.

Yadav, R., K. Y. Larbi, R. E. Young and S. Nourshargh (2003). "Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond." Thromb Haemost **90**(4): 598-606.

Yamamizu, K., K. Shinozaki, K. Ayajiki, M. Gemba and T. Okamura (2007). "Oral administration of both tetrahydrobiopterin and L-arginine prevents endothelial dysfunction in rats with chronic renal failure." J Cardiovasc Pharmacol **49**(3): 131-9.

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**(4): 537-48.

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**(46): 29393-9.

Yoo, N. J., S. H. Lee, E. G. Jeong and S. H. Lee (2007). "Expression of phosphorylated caspase-9 in gastric carcinomas." Apmis **115**(4): 354-9.

Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." Physiol Rev **74**(1): 139-62.

Yuan, J. and B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." Nature **407**(6805): 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." Free Radic Biol Med **24**(5): 722-5.

Zhang, C., L. Xie, H. Cheng and Y. Wang (2007). "TRAF3 interacts with Smac/DIABLO and enhances the proapoptotic effect of Smac/DIABLO in cytoplasm." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **39**(2): 108-16.

Zhang, D. X. and D. D. Gutterman (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2023-31.

Zhang, J., X. Wang, K. E. Bove and M. Xu (1999). "DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells." J Biol Chem **274**(52): 37450-4.

Zhang, X. D., J. J. Wu, S. Gillespie, J. Borrow and P. Hersey (2006). "Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin." Clin Cancer Res **12**(4): 1355-64.

Zhao, X., M. Mohaupt, J. Jiang, S. Liu, B. Li and Z. Qin (2007). "Tumor necrosis factor receptor 2-mediated tumor suppression is nitric oxide dependent and involves angiostasis." Cancer Res **67**(9): 4443-50.

Zheng, Y., F. Li, B. Qi, B. Luo, H. Sun, S. Liu and X. Wu (2007). "Application of perioperative immunonutrition for gastrointestinal

surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials." Asia Pac J Clin Nutr **16 Suppl 1**: 253-7.

Zon, L. I., L. Zoloth and S. Kadereit (2004). "Taking the stem cell debate to the public." PLoS Biol **2(6)**: e188.

Zornig, M., A. Hueber, W. Baum and G. Evan (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1551(2)**: F1-37.