

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado: Bioquímica Clínico-Médica e Inmunología



**GLUTATIÓN EN CÉLULAS CANCEROSAS: EFECTO DE LOS
POLIFENOLES NATURALES Y POSIBLES APLICACIONES
TERAPÉUTICAS**

Julia M. Sánchez Tormo

Dirigida por:

Dr. Guillermo Sáez Tormo

Dr. Jose María Estrela Arigüel

Valencia, 2014

D. GUILLERMO SÁEZ TORMO, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina y Odontología CIBEROBN de la Universidad de Valencia y Jefe Clínico del Servicio de Análisis Clínicos-CDB.

D. JOSÉ MARÍA ESTRELA ARIGÜEL, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: que D^a Julia María Sánchez Tormo, licenciada en Químicas por la Universidad de Valencia, ha realizado, en nuestro laboratorio y bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación que lleva por título "GLUTATIÓN EN CÉLULAS CANCEROSAS: EFECTO DE LOS POLIFENOLES NATURALES Y POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS" para la obtención del grado de Doctor.

Para que conste en cumplimiento de la legislación vigente firmamos el presente certificado en Valencia a __ de _____ de 2014.

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo

Fdo. Dr. José María Estrela Arigüel

RESUMEN

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Se han descrito numerosas evidencias experimentales apoyando el efecto beneficioso de estos compuestos en la prevención de distintas enfermedades, incluyendo diabetes mellitus, cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y otras enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

El glutatión o GSH es el tiol intracelular no proteico más abundante y está implicado en la regulación de diferentes mecanismos celulares, incluyendo antioxidación y detoxificación de xenobióticos, mantenimiento del estado redox y modulación de la respuesta inmune, entre otros. Con respecto al cáncer, el metabolismo del glutatión es capaz de jugar un rol tanto protector como patogénico; es crucial en la eliminación y detoxificación de carcinógenos, y alteraciones en esta vía pueden tener un profundo efecto en la supervivencia celular. Niveles elevados de glutatión en algunos tipos de células tumorales son capaces de protegerlas, confiriéndoles resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos.

Por tanto, la depleción del GSH combinada con la oncoterapia convencional podría ser una buena estrategia en el tratamiento contra el cáncer.

Los polifenoles naturales poseen propiedades anticancerígenas y se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, todavía no se ha estudiado en profundidad, si estos polifenoles afectan al contenido de GSH en las células cancerosas.

En esta tesis hemos estudiado el efecto del resveratrol, el pterostilbeno y la quercetina sobre el crecimiento celular *in vitro* y sobre los niveles de GSH tras 48, 72 y 96 horas de incubación. Para ello, hemos utilizado las líneas tumorales A-375 (melanoma), A-549 (pulmón), MCF-7 (mama) y HT-29 (colon). En segundo término, hemos utilizado BSO para deplecionar los niveles de GSH y estudiar cómo afecta al crecimiento celular *in vitro*.

Hemos observado, para todas las líneas estudiadas, una clara disminución en el número de células tumorales inversamente proporcional a la concentración de polifenol utilizada y al tiempo de incubación transcurrido. Así mismo, los niveles de GSH aumentan proporcionalmente a las dos condiciones experimentales anteriormente mencionadas. Al añadir BSO, conseguimos deplecionar los niveles de GSH y obtenemos una mayor disminución en el número de células tumorales presentes en cultivo.

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente investigación ha sido posible gracias a la financiación del Instituto de Salud Carlos III (FIS PI10/00802 y PREDIMED RD06/0045/0006), CIBEROBN CB12/03/30016 y de la Generalitat Valenciana ACOMP/2012/238.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Guillermo Sáez y el Dr. José María Estrela, la oportunidad de haber podido realizar esta tesis y la confianza depositada en mí. Sin sus conocimientos y su apoyo esta tesis no habría sido posible.

A Maricarmen, por su inestimable ayuda en el laboratorio.

A Ángel Ortega, a Salva Mena y a María Rodríguez por enseñarme a trabajar con cultivos celulares y por resolver mis dudas.

A toda la gente que me ha acompañado en el camino, por los buenos y los malos momentos, que me han llevado a ser la persona que soy hoy.

A Alessandra, por todos los buenos momentos, tanto en el laboratorio como fuera de él.

A Paula, siempre serás mi Chop.

A mis compañeros del doctorado, sobre todo a Johnny. Espero que todos acabemos encontrando nuestro sitio.

Al grupo de Psicobioquímica, especialmente a Miguel, que siempre ha creído en mí.

A mis compañeros de Químicas, especialmente a Lucía, Juan y Natalia. Por todas las horas que hemos pasado juntos. Sin vosotros la carrera no habría sido lo mismo.

A mis amigos, sobre todo a Laura, Irene e Isa, por todos los momentos vividos a lo largo de estos años. Por estar siempre ahí con al menos un hombro y un oído disponibles.

A Jaime, por todo lo que he aprendido contigo, que no ha sido poco.

A Antonio y Amanda, por considerarme como una hija, y a Benja por considerarme como una hermana, además de su hacker personal.

A mi familia, especialmente a mi primo Héctor y a mi tío Juan.

A mis padres, por ayudarme a crecer como persona y como profesional. Por todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por vuestro ejemplo.

A Rubén. Por tu paciencia, especialmente estos últimos meses. Por ayudarme a superarme. Por saber sacarme una sonrisa. Por ser mi compañero. Gracias por ser mi red.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	i
Agradecimientos.....	iii
Tabla de contenido.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de imágenes y fotografías.....	xiv
Lista de tablas.....	xv
Lista de gráficas.....	xvi
Glosario de abreviaturas.....	xviii
Capítulo I Introducción.....	23
I.1 Neoplasia y metástasis.....	23
I.1.1 Consideraciones generales.....	23
I.1.2 Fases del proceso metastásico. Implicaciones moleculares.....	26
I.1.2.1 Formación del tumor primario.....	27
I.1.2.1.a Protooncogenes.....	29
I.1.2.1.b Genes supresores de tumores.....	33
I.1.2.1.c Epigenética del cancer.....	36
I.1.2.2 Angiogénesis.....	41
I.1.2.2.a El cambio angiogénico.....	41
I.1.2.2.b Inhibición de la angiogénesis como tratamiento contra el cáncer.....	45
I.1.2.3 Invasión primaria.....	47
I.1.2.3.a Adhesión de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular.....	48
I.1.2.3.b Degradación local de la matriz por enzimas proteolíticos.....	50
I.1.2.3.c Locomoción de las células tumorales a través de la matriz modificada.....	51
I.1.2.4 Diseminación de las células tumorales.....	52
I.1.2.5 Detención de las células a nivel de los capilares del órgano diana.....	53
I.1.2.6 Invasión secundaria.....	54
I.1.2.7 Tumor dormido.....	55
I.2 Regulación de la proliferación celular.....	57
I.2.1 Bases moleculares del ciclo celular.....	57

I.2.2 Senescencia celular	64
I.2.3 Muerte celular	65
I.2.3.1 Muerte regulada de tipo I: Apoptosis	65
I.2.3.1.a Vía extrínseca o de los "receptores de muerte"	66
I.2.3.1.b Vía intrínseca o del estrés celular (o mitocondrial)	67
I.2.3.2 Muerte regulada de tipo II: Autofagia	70
I.2.3.3 Muerte no regulada: Necrosis	72
I.2.3.4 Catástrofe mitótica	72
I.2.3.5 Evasión de la apoptosis en células tumorales	73
I.3 Papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis	75
I.3.1 Introducción. Concepto de radical libre	75
I.3.2 Especies reactivas de oxígeno	76
I.3.2.1 Oxígeno molecular singlete (O_2^1)	77
I.3.2.2 Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	78
I.3.2.3 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	78
I.3.2.4 Radical $\cdot OH$	79
I.3.2.5 Radicales alcóxido ($RO\cdot$) y radicales peróxido ($ROO\cdot$)	79
I.3.3 Especies reactivas de nitrógeno	79
I.3.4 Fuentes de especies reactivas	82
I.3.4.1 Mitocondria	82
I.3.4.2 Retículo endoplasmático y peroxisomas	83
I.3.4.3 "Estallido respiratorio"	84
I.3.4.4 Oxidación de pequeñas moléculas	84
I.3.4.5 Enzimas citosólicas	84
I.3.5 Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo	85
I.3.5.1 Sistema enzimático	86
I.3.5.2 Sistema no enzimático	87
I.3.6 Telómeros, senescencia, envejecimiento y cáncer	88
I.3.7 Estrés oxidativo, estrés nitrosativo y progresión tumoral	93
I.3.7.1 Daños moleculares inducidos por ROS/RNS	95
I.3.7.1.a Lípidos	95
I.3.7.1.b Proteínas	97
I.3.7.1.c Glúcidos	98
I.3.7.1.d Ácidos nucleicos	98

I.4 Efecto antitumoral de los polifenoles	102
I.4.1 Polifenoles naturales	102
I.4.2 Clasificación y estructura química de polifenoles	103
I.4.3 Biodisponibilidad de los polifenoles	107
I.4.4 Polifenoles y efecto anticanceroso	110
I.4.4.1 Resveratrol	110
I.4.4.2 Pterostilbeno	110
I.4.4.3 Quercetina	111
I.5 Papel del GSH en la regulación del ciclo celular y apoptosis. Depleción de GSH y posibles aplicaciones en la terapia anticancerosa.	112
I.5.1 Glutación	112
I.5.1.1 Síntesis y degradación del glutación	113
I.5.1.2 Papel del glutación en la fisiología celular	115
I.5.1.3 Cociente GSH/GSSG como indicador del estado redox.....	116
I.5.1.4 Regulación negativa de los niveles de GSH.....	117
I.5.2 Glutación, apoptosis y cáncer.....	118
Capítulo II Hipótesis de trabajo	119
Capítulo III Objetivos	121
Capítulo IV Material y metodología.....	123
IV.1 Materiales.....	123
IV.1.1 Sustrato biológico: Cultivos celulares.....	123
IV.1.1.1 Fibroblastos de ratón Balb/c 3T3	124
IV.1.1.2 Melanoma (A-375)	125
IV.1.1.3 Pulmón (A-549)	126
IV.1.1.4 Mama (MCF-7).....	127
IV.1.1.5 Colon (HT-29)	128
IV.1.2 Equipamiento	129
IV.1.2.1 Equipamiento del departamento	129
IV.1.2.2 Equipamiento del laboratorio.....	129
IV.1.2.3 Equipamiento del laboratorio de cultivos celulares	129
IV.1.3 Materiales e instrumental de laboratorio	130
IV.1.3.1 Material de laboratorio	130
IV.1.3.2 Material de cultivos celulares	130

IV.2 Métodos.....	132
IV.2.1 Cultivo de las líneas celulares.....	132
IV.2.1.1 Utilización.....	132
IV.2.1.2 Ventajas y desventajas.....	133
IV.2.1.3 Medidas de seguridad.....	134
IV.2.1.4 Preparación del medio de cultivo.....	135
IV.2.1.5 Descongelación de células.....	135
IV.2.1.6 Subcultivo de líneas celulares continuas en monocapa.....	136
IV.2.1.7 Congelación de células.....	137
IV.2.2 Estudio de proliferación y viabilidad celular.....	137
IV.2.3 Curva de crecimiento.....	139
IV.2.4 Tiempo de doblaje o PDT (Population doubling time).....	140
IV.2.5 Aislamiento, cuantificación y digestión del ADN.....	141
IV.2.6 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado.....	142
IV.2.7 Cuantificación del Malondialdehido (MDA).....	143
IV.2.8 Determinación de 8-oxo- dG por HPLC.....	143
IV.2.9 Determinación de Glutación oxidado (GSSG).....	144
IV.2.10 Determinación de Glutación reducido (GSH).....	144
IV.2.11 Determinación GSSG/GSH.....	145
IV.2.12 Determinación del glutación total.....	145
IV.2.13 Ensayos de actividad enzimática: γ -GCS y GS.....	145
IV.2.14 Análisis de células viables y de muerte celular.....	146
IV.2.15 Análisis de la distribución de las fases del ciclo celular.....	146
IV.2.16 Análisis estadístico.....	147
Capítulo V Resultados experimentales.....	149
V.1 Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3.....	149
V.1.1 8-oxo-dG.....	152
V.1.2 MDA.....	153
V.1.3 GSH.....	154
V.1.4 GSSG.....	155
V.1.5 GSSG/GSH.....	156
V.2 Curvas de crecimiento, tiempo de doblaje y niveles de GSH.....	157
V.2.1 Melanoma (A-375).....	157

V.2.2 Pulmón (A-549)	158
V.2.3 Mama (MCF-7)	158
V.2.4 Colon (HT-29).....	159
V.3 Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento in vitro de las células.....	159
V.3.1 Melanoma (A-375).....	160
V.3.2 Pulmón (A-549)	162
V.3.3 Mama (MCF-7)	164
V.3.4 Colon (HT-29).....	166
V.4 Análisis de muerte celular y de la distribución de las fases del ciclo celular.....	169
V.5 Efecto de los polifenoles sobre los niveles de GSH	170
V.5.1 Melanoma (A-375).....	170
V.5.1.1 48 horas post-siembra	170
V.5.1.2 72 horas post-siembra	171
V.5.1.3 96 horas post-siembra	172
V.5.2 Pulmón (A-549)	174
V.5.2.1 48 horas post-siembra	174
V.5.2.2 72 horas post-siembra	175
V.5.2.3 96 horas post-siembra	176
V.5.3 Mama (MCF-7)	178
V.5.3.1 48 horas post-siembra	178
V.5.3.2 72 horas post-siembra	179
V.5.3.3 96 horas post-siembra	181
V.5.4 Colon (HT-29).....	182
V.5.4.1 48 horas post-siembra	182
V.5.4.2 72 horas post-siembra	183
V.5.4.3 96 horas post-siembra	184
V.6 Síntesis y eflujo de GSH.....	186
V.7 Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento in vitro de las células deplecionadas de GSH....	187
V.7.1 Melanoma (A-375).....	188
V.7.2 Pulmón (A-549)	189
V.7.3 Mama (MCF-7)	191
V.7.4 Colon (HT-29).....	192
V.8 Depleción de GSH con BSO	194

V.8.1 Melanoma (A-375).....	194
V.8.2 Pulmón (A-549)	195
V.8.3 Mama (MCF-7)	197
V.8.4 Colon (HT-29).....	198
Capítulo VI Discusión de resultados	201
VI.1 Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3	201
VI.2 Efecto de los polifenoles y de la BSO sobre la proliferación tumoral in vitro	203
VI.2.1 Melanoma (A-375).....	203
VI.2.2 Pulmón (A-549)	204
VI.2.3 Mama (MCF-7)	204
VI.2.4 Colon (HT-29).....	205
VI.3 Análisis de muerte celular y de la distribución de las fases del ciclo celular.....	206
VI.4 Efecto de los polifenoles y de la BSO sobre los niveles de GSH.....	210
Capítulo VII Conclusiones	215
Bibliografía	217

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 Capacidades adquiridas del cáncer	25
Figura I.2 Proceso metastásico.....	26
Figura I.3 Cáncer: mutaciones y cambios epigenéticos	28
Figura I.4 Cascada de señales en el ciclo celular	29
Figura I.5 Mecanismos que permiten la transformación de un protooncogén en oncogén	30
Figura I.6 Señalización de Ras	32
Figura I.7 Circuito molecular del cáncer.....	33
Figura I.8 Inducción de p53 por ARF	35
Figura I.9 Modificaciones en las histonas	36
Figura I.10 Hipometilación del ADN	39
Figura I.11 Hipermetilación de genes supresores de tumores	39
Figura I.12 Cambio angiogénico	42
Figura I.13 Formación de nuevos vasos sanguíneos.....	44
Figura I.14 Progresión de los astrocitomas.....	45
Figura I.15 Modos de formación de los vasos en la angiogénesis.....	47
Figura I.16 Propagación de las células tumorales	48
Figura I.17 Proteínas transmembrana de unión célula-célula	49
Figura I.18 Mecanismos de latencia del cáncer	56
Figura I.19 Etapas del ciclo celular	58
Figura I.20 Conmutador molecular del ciclo celular	60
Figura I.21 Primer fragmento del ciclo celular	60
Figura I.22 Segundo fragmento del ciclo celular	61
Figura I.23 Ciclo celular	62
Figura I.24 Respuestas de las células a distintos tipos de estrés	64
Figura I.25 Proceso de apoptosis por vía extrínseca	67
Figura I.26 Formación del apoptosoma y activación de la caspasa-9.....	68
Figura I.27 Proceso de apoptosis por vía intrínseca	68
Figura I.28 Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2	69
Figura I.29 Equilibrio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas.....	70
Figura I.30 Proceso de autofagia	71

Figura I.31	Proceso de necrosis.....	72
Figura I.32	Ruta de señalización PI3K/AKT	74
Figura I.33	Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno	77
Figura I.34	Formación de ROS	78
Figura I.35	Biosíntesis del NO a partir de la arginina	80
Figura I.36	Fuentes de ROS intracelulares	82
Figura I.37	Generación de ROS en la cadena de transporte electrónico	83
Figura I.38	ROS generadas por leucocitos activados	84
Figura I.39	Generación de O ₂ [•] por el sistema de la XO.....	85
Figura I.40	Vitamina C en su forma reducida y oxidada.....	87
Figura I.41	Estructura de la vitamina E	87
Figura I.42	Estructura de los β-carotenos	88
Figura I.43	Estructura del licopeno.....	88
Figura I.44	Estructura de los telómeros.....	89
Figura I.45	Solución del problema de la telomerasa	90
Figura I.46	Terapias antitumorales que implican a la telomerasa	93
Figura I.47	Dianas moleculares de las ROS/RNS.....	95
Figura I.48	Mecanismo de peroxidación lipídica	96
Figura I.49	Oxidación de la Guanosina	99
Figura I.50	Comparación de las estructuras de los pares de bases G-C y T-A con 8-oxoG-C y 8-oxoG-A	99
Figura I.51	Reparación del ADN	100
Figura I.52	Inestabilidad del ADN y papel regulador de la proteína p53 en la protección del material genómico.....	101
Figura I.53	Implicación del EO en la progresión de lesiones genéticas.	101
Figura I.54	Estructura de los flavonoides	105
Figura I.55	Estructura de los estilbenos simples	105
Figura I.56	Vía del fenilpropanoide para la formación de estilbenoides y de flavonoides.	106
Figura I.57	Esquema de absorción, transformación y excreción de xenobióticos.	108
Figura I.58	Factores que influyen en la biodisponibilidad de los polifenoles	108
Figura I.59	Estructura del trans-resveratrol	110
Figura I.60	Estructura del trans-pterostilbeno	111
Figura I.61	Estructura de la quercetina	111

Figura I.62 La quercetina cumple los tres criterios de Bors	112
Figura I.63 Estructura del glutatión reducido y oxidado	113
Figura I.64 Ciclo del γ -glutamilo	114
Figura I.65 Ciclo redox del glutatión.....	115
Figura I.66 Estructura del tert-butil hidroperóxido	117
Figura I.67 Estructura de la L-butionina-[S,R]-sulfoximina	117
Figura IV.1 Utilización de los cultivos celulares en investigación básica y aplicada.....	133

LISTA DE IMÁGENES Y FOTOGRAFÍAS

Fotografía IV-I	124
Fotografía IV-II	125
Fotografía IV-III	126
Fotografía IV-IV	127
Fotografía IV-V	128
Imagen IV-VI	138
Imagen IV-VII	139

LISTA DE TABLAS

Tabla I-1 Factores reguladores de la angiogénesis	44
Tabla I-2 Clasificación de la familia Bcl-2.....	69
Tabla I-3 Principales familias de los compuestos fenólicos	104
Tabla IV-1	136
Tabla V-1 Control: Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3.....	150
Tabla V-2 Experimento 1 - Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3	151
Tabla V-3 Experimento 2 - Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3	151
Tabla V-4 Análisis de muerte celular	169
Tabla V-5 Distribución de las fases del ciclo celular	169
Tabla V-6	170
Tabla V-7	172
Tabla V-8	173
Tabla V-9	175
Tabla V-10	176
Tabla V-11	177
Tabla V-12	179
Tabla V-13	180
Tabla V-14	181
Tabla V-15	183
Tabla V-16	184
Tabla V-17	185
Tabla V-18	186
Tabla V-19	186

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica IV-I Curva de crecimiento	140
Gráfica V-I Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de 8-oxo-dG	152
Gráfica V-II Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de MDA.....	153
Gráfica V-III Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de GSH	154
Gráfica V-IV Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de GSSG	155
Gráfica V-V Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre la relación GSSG/GSH	156
Gráfica V-VI Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células A-375	157
Gráfica V-VII Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células A-549	158
Gráfica V-VIII Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células MCF-7	158
Gráfica V-IX Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células HT-29.....	159
Gráfica V-X Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de A-375	161
Gráfica V-XI Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de A-375.....	161
Gráfica V-XII Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de A-375	162
Gráfica V-XIII Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de A-549	163
Gráfica V-XIV Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de A-549	163
Gráfica V-XV Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de A-549	164
Gráfica V-XVI Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de MCF-7	165
Gráfica V-XVII Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de MCF-7	165
Gráfica V-XVIII Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de MCF-7	166
Gráfica V-XIX Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de HT-29	167
Gráfica V-XX Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de HT-29.....	167
Gráfica V-XXI Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de HT-29	168
Gráfica V-XXII Efecto de los PF en células A-375 a las 48h post-siembra	171
Gráfica V-XXIII Efecto de los PF en células A-375 a las 72h post-siembra	172
Gráfica V-XXIV Efecto de los PF en células A-375 a las 96h post-siembra	174
Gráfica V-XXV Efecto de los PF en células A-549 a las 48h post-siembra	175
Gráfica V-XXVI Efecto de los PF en células A-549 a las 72h post-siembra	176
Gráfica V-XXVII Efecto de los PF en células A-549 a las 96h post-siembra	178
Gráfica V-XXVIII Efecto de los PF en células MCF-7 a las 48h post-siembra.....	179
Gráfica V-XXIX Efecto de los PF en células MCF-7 a las 72h post-siembra.....	180

Gráfica V-XXX Efecto de los PF en células MCF-7 a las 96h post-siembra	182
Gráfica V-XXXI Efecto de los PF en células HT-29 a las 48h post-siembra	183
Gráfica V-XXXII Efecto de los PF en células HT-29 a las 72h post-siembra	184
Gráfica V-XXXIII Efecto de los PF en células HT-29 a las 96h post-siembra	185
Gráfica V-XXXIV Efecto del pterostilbeno sobre las células A-375 tratadas con BSO.....	188
Gráfica V-XXXV Efecto del resveratrol sobre las células A-375 tratadas con BSO	189
Gráfica V-XXXVI Efecto del pterostilbeno sobre las células A-549 tratadas con BSO.....	190
Gráfica V-XXXVII Efecto del resveratrol sobre las células A-549 tratadas con BSO	190
Gráfica V-XXXVIII Efecto del pterostilbeno sobre las células MCF-7 tratadas con BSO	191
Gráfica V-XXXIX Efecto del resveratrol sobre las células MCF-7 tratadas con BSO.....	192
Gráfica V-XL Efecto del pterostilbeno sobre las células HT-29 tratadas con BSO.....	193
Gráfica V-XLI Efecto del resveratrol sobre las células HT-29 tratadas con BSO	193
Gráfica V-XLII Niveles de GSH para células A-375 tratadas con BSO y pterostilbeno.....	194
Gráfica V-XLIII Niveles de GSH para células A-375 tratadas con BSO y resveratrol.....	195
Gráfica V-XLIV Niveles de GSH para células A-549 tratadas con BSO y pterostilbeno.....	196
Gráfica V-XLV Niveles de GSH para células A-549 tratadas con BSO y resveratrol	196
Gráfica V-XLVI Niveles de GSH para células MCF-7 tratadas con BSO y pterostilbeno	197
Gráfica V-XLVII Niveles de GSH para células MCF-7 tratadas con BSO y resveratrol.....	198
Gráfica V-XLVIII Niveles de GSH para células HT-29 tratadas con BSO y pterostilbeno	199
Gráfica V-XLIX Niveles de GSH para células HT-29 tratadas con BSO y resveratrol.....	199

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

•OH	Radical hidroxilo
8-oxo-dG	8-oxo-7,8'-2-deoxiguanosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMFs	Factores de motilidad autocrinos
Ang	Angiopoyetina
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BSO	L-butionina-(S, R)-sulfoximina
CAM	Moléculas de adhesión celular
Cat	Catalasa
CdKIs	Proteínas inhibidoras de las CdKs
CdKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenceno
COX	Ciclooxigenasa
CpG	Citosinas que preceden a guaninas
CSCs	Células madre tumorales
CTCs	Células tumorales en circulación
DD	Dominio de muerte
DIABLO	Proteína de unión directa a IAP de bajo pI
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E2F	Factor de transcripción

EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR / ErbB1	Receptor 1 de factor de crecimiento epidérmico
EN	Estrés nitrosativo
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EO	Estrés oxidativo
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 / caspasa 8
FMN	Flavín mononucleótido
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor de intercambio del nucleótido guanina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado / disulfuro
GST	Glutación-S-transferasa
GSTP1	Gen glutación-S-transferasa pi 1
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HAT	Histona acetiltransferasas
HDAC	Histona deacetilasas

Her-2 / ErbB2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IFN- γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JNK	Quinasa n-terminal de c-Jun
MDA	malondialdehído
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MPO	Mieloperoxidasa
mPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida
NK	Células natural-killer
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitritos
NOS	Sintasas de óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Radical superóxido

O ₂ ¹	Oxígeno molecular singlete
PCA	Ácido perclórico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PKC	Proteína quinasa C
pRB	Proteína del retinoblastoma
Pter	Pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4-hidroxi-trans-estilbeno)
Quer	Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona)
Resv	Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RO•	Radical alcóxido
ROO•	Radical peróxido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAPK	Proteínas quinasas activadas por estrés
SMAC	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TAM	Macrófagos asociados a tumores
TAN	Neutrófilos asociados a tumores
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	tert-butil hidroperóxido
TGF	Factor de crecimiento transformante

TM	Dominio transmembrana
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador del plasminógeno tisular
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF
TSGs	Genes supresores de tumores
TSP	Trombospondina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
uPA	Activador del plasminógeno uroquinasa
VEB	Virus de Epstein-Barr
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
XO	Xantina oxidasa

"What we know is a drop, what we don't know is an ocean."

Isaac Newton

I.1 Neoplasia y metástasis

I.1.1 Consideraciones generales.

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo anormal de las células, que poseen la capacidad de dividirse y crecer de forma incontrolada.

Cuando estas células alcanzan una población elevada se forma una masa, denominada "tumor" o "neoplasia", que en su expansión invade y coloniza los tejidos normales.

En la actualidad existen más de un centenar de tipos de cáncer. El tipo de cáncer se define entre otras cosas por el tejido u órgano en el que se formó, pero de forma general se pueden clasificar en 4 grandes grupos [1]:

- **Carcinomas.** Se trata de cánceres que se originan a partir de células epiteliales. Estas células tapizan la superficie de órganos, glándulas o estructuras corporales. Representan más del 80% de la totalidad de los cánceres, incluyendo las variedades más comunes de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, páncreas y estómago, entre otros.
- **Sarcomas.** Son cánceres que se forman a partir del llamado tejido conectivo o conjuntivo, del que derivan los músculos, los huesos, los cartílagos o el tejido graso. Los más frecuentes son los sarcomas óseos.
- **Leucemias.** Son cánceres que se originan en la médula ósea, que es el tejido encargado de mantener la producción de glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Las alteraciones en estas células pueden producir, respectivamente, anemia, infecciones y alteraciones de la coagulación (sangrados o trombosis).

- **Linfomas.** Se desarrollan a partir del tejido linfático, como el existente en ganglios y órganos linfáticos.

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial. En 2008 causó 7,6 millones de defunciones en todo el mundo (aproximadamente un 13% del total) y se prevé que alcancen los 13,1 millones en 2030 [2]. La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) estima que en el año 2015 se diagnosticarán 220.000 casos nuevos en España. En el año 2010 ocasionó más de 100.000 muertes y fue la primera causa de mortalidad en nuestro país, superando ya a las enfermedades cardiovasculares [3]. Se calcula que a una de cada tres personas se le diagnosticará cáncer en algún momento de su vida [4].

El número de supervivientes de cáncer a largo plazo es cada vez mayor, y se prevé que su número se eleve considerablemente como consecuencia del diagnóstico precoz y de la mayor eficacia de los tratamientos oncológicos. Los últimos datos ponen de manifiesto una supervivencia a los 5 años del 65%, dependiendo de la localización tumoral y de la extensión de la enfermedad. En España los datos son del 52% en mujeres y del 40% en varones [5].

A pesar de estas estadísticas, aquellos que padecen cáncer avanzado, especialmente de algunos tipos, pueden tener supervivencias mucho más cortas. El comportamiento, pronóstico y tratamiento de los diversos tipos de cáncer, incluso dentro de las distintas fases evolutivas de un mismo tumor, son muy diferentes.

La elevada complejidad del cáncer (cada paciente posee alteraciones moleculares y celulares específicas) junto con su elevada incidencia lo convierten en una línea de investigación prioritaria.

Cabe destacar que no todos los tumores son “malignos” (cancerosos); los tumores que no se diseminan ni infiltran en los tejidos los vecinos se consideran “benignos”. Los tumores benignos habitualmente pueden extirparse mediante cirugía sin causar grandes daños en el organismo.

Además de la diseminación e infiltración, existen otras alteraciones comunes en la fisiología de la célula tumoral que dictaminan un crecimiento maligno en prácticamente todos los tipos de cáncer [6].

A diferencia de las células normales, las células tumorales muestran una baja dependencia de estímulos mitogénicos para iniciar un estado de proliferación y se comportan como si se encontrasen continuamente sujetas a un mecanismo de estimulación autocrino.

Por otra parte, poseen mecanismos para evadir las señales de inhibición del crecimiento, principalmente mediante la alteración de la ruta de la pRB (proteína del retinoblastoma), proteína que inhibe la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis.

Además, evaden la apoptosis, bien mediante la sobreexpresión de oncogenes o mediante la alteración de genes supresores de tumores, principalmente el gen p53, que se encuentra mutado en aproximadamente un 50% de los tumores humanos.

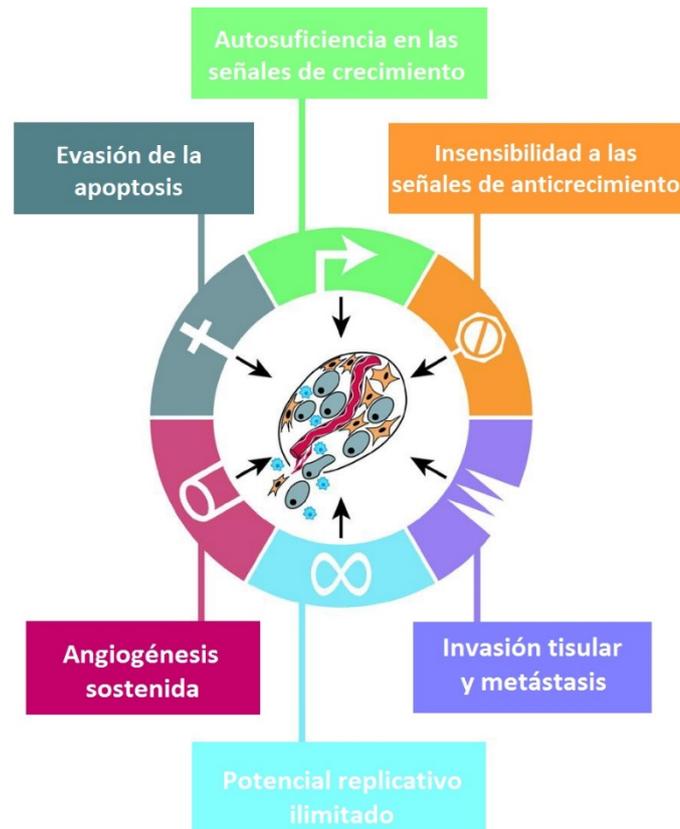


Figura I.1 Capacidades adquiridas del cáncer

Adaptado de Hanahan D. y Weinberg R. (2000) *The Hallmarks of Cancer* [6]

Poseen también potencial replicativo ilimitado. La mayoría de los tejidos humanos no muestran actividad de la telomerasa; se encuentra presente en las células germinales y en las líneas celulares inmortalizadas, donde se mantiene constante la longitud de los telómeros. El 85% de las líneas de células tumorales mantienen la longitud de los telómeros y expresan altos niveles de la telomerasa. Estas evidencias parecen indicar que existe una fuerte correlación entre la activación de la telomerasa y la estabilización de los telómeros, que es crucial para la inmortalización de la célula y para la tumorigénesis [7].

Son capaces a su vez de desarrollar angiogénesis sostenida. La angiogénesis es el proceso fisiológico de formar nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Del mismo modo que los tejidos normales, los tumores requieren de oxígeno y aporte de nutrientes para crecer, así como de una vía efectiva para la eliminación de desechos celulares [8].

Por último, como hemos mencionado anteriormente, muchos tumores poseen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes, diseminarse y producir metástasis (tumores secundarios en órganos distantes). El 90% de las muertes por cáncer se producen debido a metástasis.

I.1.2 Fases del proceso metastásico. Implicaciones moleculares

Para que el proceso metastásico (o "cascada metastásica") tenga lugar se requieren una serie de pasos.

Como ya hemos comentado anteriormente, a medida que el tumor primario (foco inicial del tumor) crece, necesita una red de vasos sanguíneos para cubrir sus necesidades metabólicas. Estos vasos proporcionan una vía de escape a las células, que pueden abandonar el tumor y ser transportadas por el torrente sanguíneo o la linfa hasta los órganos diana donde se extravasarán. Una vez situadas en el nuevo tejido, las células deben iniciar la proliferación para formar micrometástasis y mediante un proceso de angiogénesis sostenida, llegar a formar un tumor macroscópico (tumor secundario o metástasis) [9].

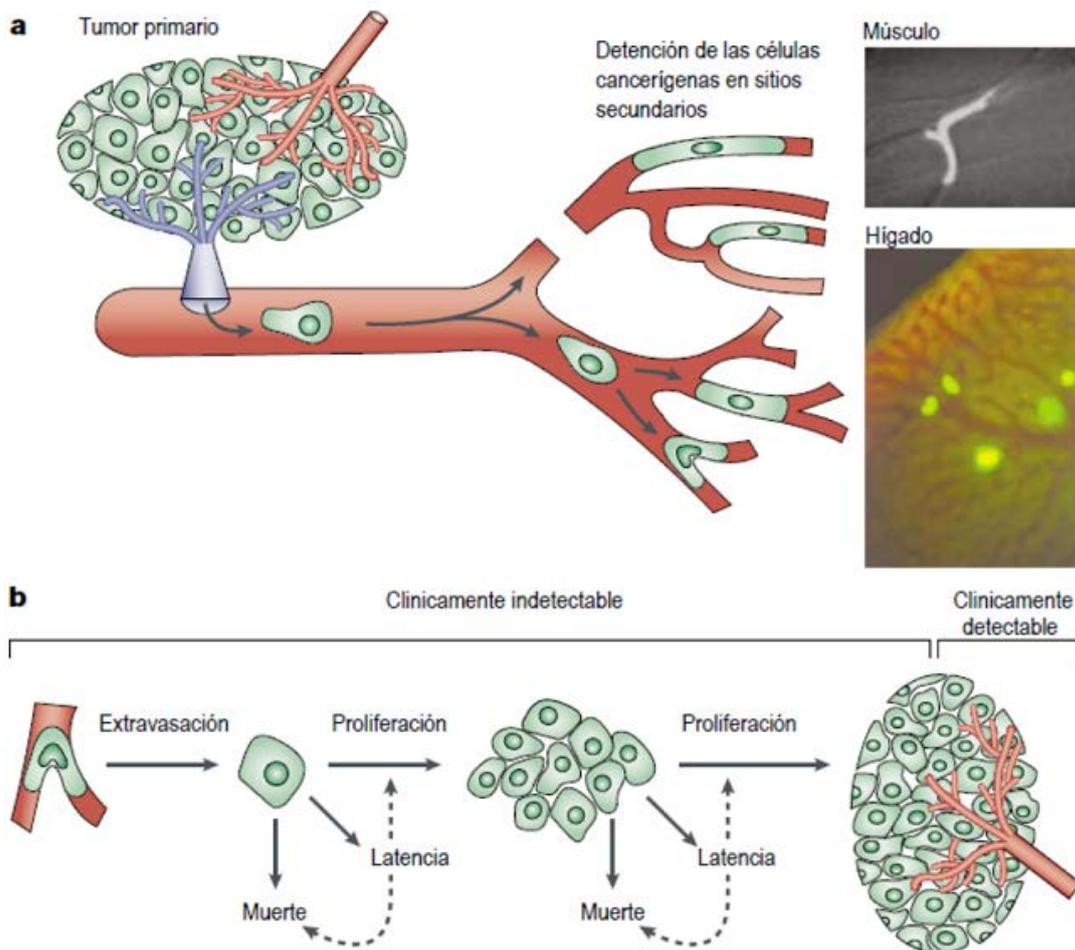


Figura I.2 Proceso metastásico

Adaptado de Chambers, A. et al. (2002)

Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [9]

Por qué se forman metástasis en unos órganos u otros ha sido objeto de controversia desde hace más de un siglo. En 1889, Stephen Paget publicó la teoría de la semilla y el terreno ("The seed and soil hypothesis") [10] para explicar que la ubicación de las metástasis no era aleatoria. En su artículo describía la propensión de diversos tipos de cáncer a formar metástasis en órganos específicos. Hipotetizaba que

algunos tipos de células tumorales ("semilla") tenían una afinidad específica por ciertos órganos ("terreno") y que sólo se formaba metástasis cuando "la semilla y el terreno" eran compatibles [9], [11].

Esta idea fue cuestionada en 1928 por James Ewing, quien sugirió que la diseminación metastásica ocurría únicamente por patrones circulatorios entre el tumor primario y órganos secundarios específicos [12]. Esta hipótesis se conoce como "teoría mecanicista".

Posteriores estudios muestran evidencias de que ambas teorías no son excluyentes. [13], [14] Se ha llegado a la conclusión de que las metástasis desarrolladas en zonas cercanas pueden atribuirse a la circulación por los vasos sanguíneos o linfáticos, mientras que las metástasis en órganos distantes son específicas para muchos tipos de cáncer (patrones metastásicos selectivos) [15]–[17]. Un buen ejemplo son los tumores de mama, próstata y pulmón que frecuentemente producen metástasis óseas [18]. Los cánceres colorrectal y pancreático, por su parte, a menudo desarrollan metástasis en hígado y pulmones [19].

I.1.2.1 Formación del tumor primario

El proceso neoplásico está caracterizado por una pérdida del control del ciclo y de la diferenciación celular formándose de este modo una masa tumoral primaria. [20]

La pérdida de regulación del ciclo celular se debe a alteraciones genéticas (mutaciones). 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, amplificaciones del gen o deleciones [4].

En el transcurso de la vida de un ser humano se producen unas 10^{16} divisiones celulares y se producirán espontáneamente unas 10^{-6} mutaciones por gen y división celular, por lo que cada gen es susceptible de haber padecido mutaciones en 10^{10} ocasiones independientes a lo largo de la vida de un ser humano [21].

Las alteraciones en el ADN pueden producirse también por agentes carcinógenos externos. De hecho se considera que aproximadamente un 80-90% de los cánceres humanos son inducidos por factores ambientales, de los cuales un 30-40% son debidos a carcinógenos presentes en la dieta [22]. Podemos distinguir tres tipos de agentes carcinógenos externos [2]:

- físicos, como las radiaciones ionizantes
- químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida)
- biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

También la edad es un factor clave en el desarrollo del cáncer. Los estudios realizados parecen señalar que a medida que una especie envejece, su capacidad de respuesta antioxidante se ve alterada, lo que contribuye a un mayor grado de lesiones moleculares y orgánicas por estrés oxidativo (EO) [23].

Esto lleva al organismo a acumular muchas mutaciones independientes, aleatorias y con baja probabilidad, pudiendo derivar en la malignización de las células.

En la mayoría de los casos, estas alteraciones son reparadas por las enzimas de reparación del ADN. Si se producen en genes críticos suelen ser letales para la célula.

Un porcentaje de las células mutantes presentará alteraciones en genes relacionados con la regulación del crecimiento y de la división celular, y por tanto, no obedecerán las restricciones normales sobre la proliferación celular [21].

Una única mutación no origina la transformación de una célula normal en maligna. Se requiere de una acumulación de mutaciones no reparadas, acompañada de cambios epigenéticos (alteraciones de la expresión génica que son heredables pero no debidas a cambios en la secuencia de ADN), para la formación de un tumor [22]. En humanos se requieren al menos entre cuatro y seis mutaciones [24], en ocasiones pueden necesitarse hasta doce [4].

Las células cancerígenas habitualmente poseen un número anormal de cromosomas o no pueden mantener la integridad de los mismos, fenómeno denominado aneuploidía. De forma, que acumulan grandes anomalías en su cariotipo que son visibles durante el proceso de mitosis. Además, como crecen y se dividen rápidamente, muchas veces no pueden reparar el ADN dañado o corregir los diversos errores de replicación, lo cual hace que acumulen cambios genéticos a una velocidad muy elevada. Este fenómeno se conoce como "inestabilidad genética" [21], [25].

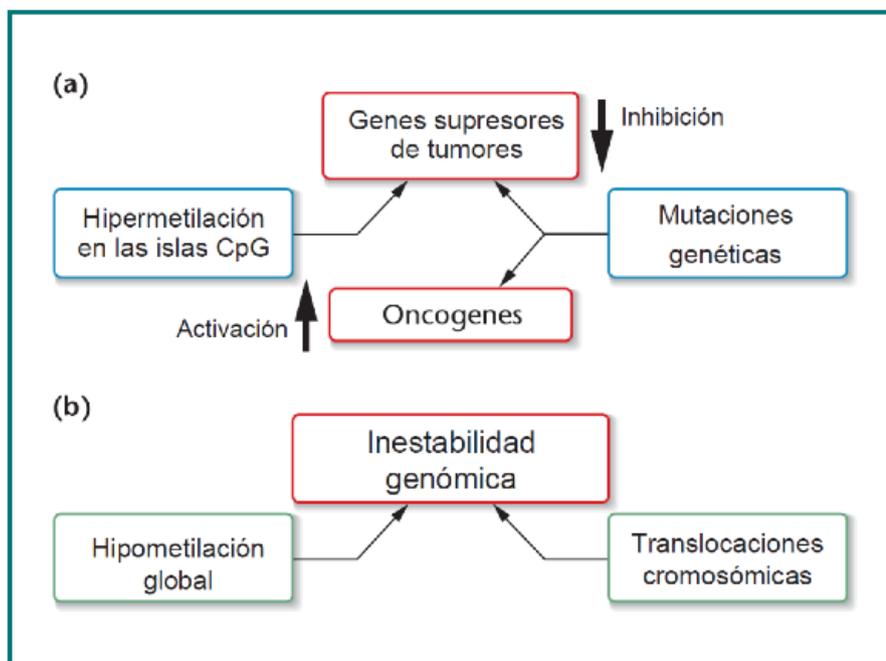


Figura 1.3 Cáncer: mutaciones y cambios epigenéticos
Adaptado de Klug W. et al. (2012) *Concepts of genetics* [4]

La inestabilidad genética se ve amplificada cuando algunos de los cambios en el ADN alteran los mecanismos epigenéticos de control. Diversos grupos de investigación han mostrado que la hipometilación del ADN es una de las características comunes en el cáncer; en algunos casos también se produce una hipermetilación selectiva y el silenciamiento de genes, como veremos más adelante.

Diversos estudios avalan la teoría de que todas las células que conforman un tumor provienen de la misma célula ancestral, que es la que acumuló las mutaciones específicas. Este concepto es importante para entender las causas moleculares del cáncer y sus implicaciones en el diagnóstico.

La lista actual de genes responsables del cáncer incluye 70 genes asociados con mutaciones en la línea germinal y 342 genes asociados con mutaciones somáticas [25]. Pero de forma general podemos clasificar las mutaciones en en dos amplias clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores.

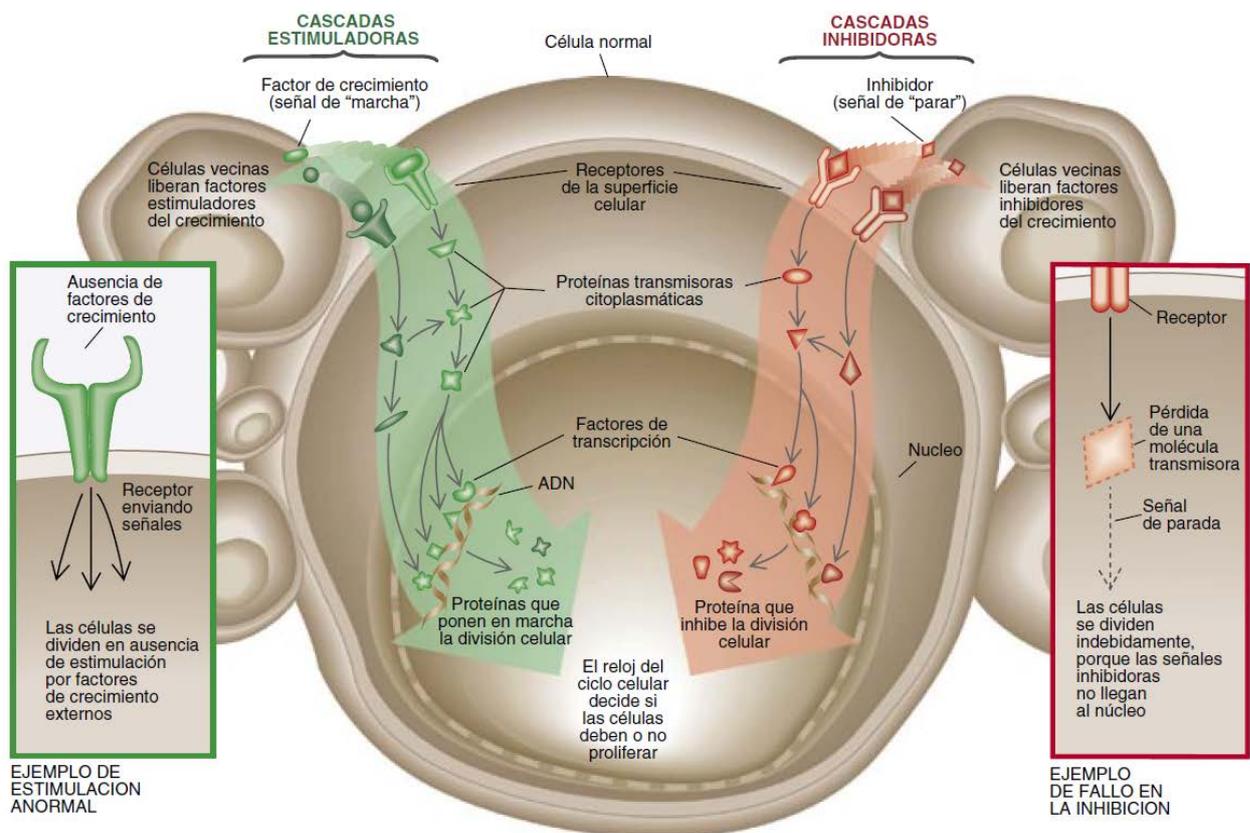


Figura 1.4 Cascada de señales en el ciclo celular
Weinberg R. A. (1996) *Así se produce el cáncer* [26]

1.1.2.1.a Protooncogenes

Los protooncogenes codifican proteínas que activan la proliferación celular, inhiben la diferenciación celular y bloquean la apoptosis. Todos estos procesos son importantes para el desarrollo normal y el mantenimiento de órganos y tejidos. Un oncogén es una versión mutada de un protooncogén y normalmente presenta una producción excesiva de estas proteínas [25].

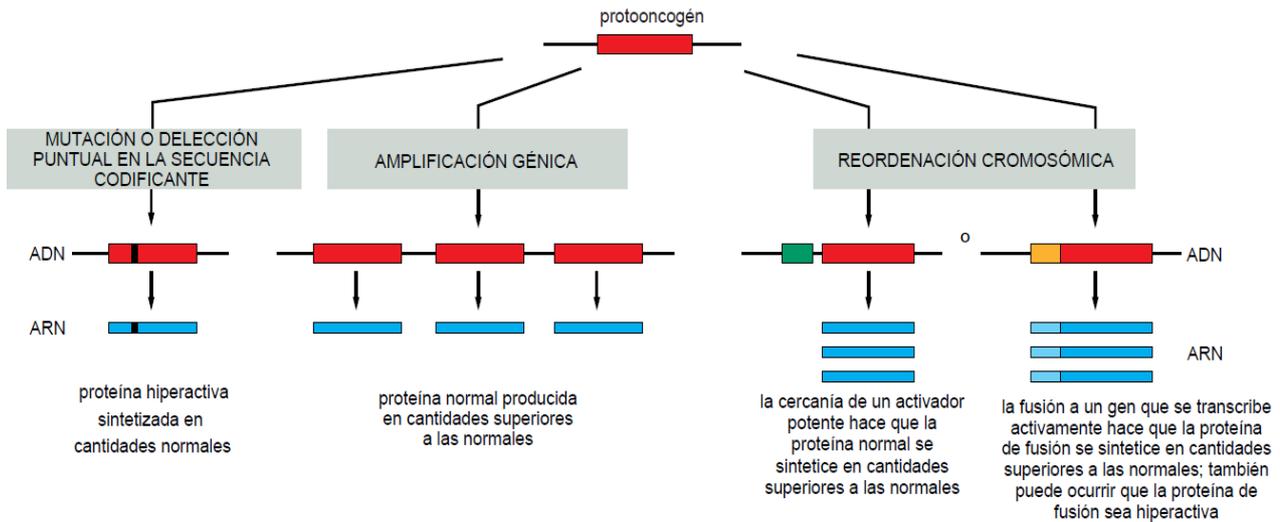


Figura 1.5 Mecanismos que permiten la transformación de un protooncogén en oncogén
Adaptado de Alberts B. *et al.* (2002) *Molecular Biology of the Cell* [27]

En un estudio reciente, se analizaron las mutaciones en los protooncogenes de 1000 muestras tumorales pertenecientes a 17 tipos de cáncer. El estudio mostró que 14 de los protooncogenes analizados tienen una elevada propensión a generar cáncer. Estos protooncogenes están asociados con diversas funciones celulares [28].

Los protooncogenes pueden codificar proteínas que actúan a diferentes niveles de la cascada de señalización que activa la proliferación celular. Como responsables de la proliferación celular, constituyen una importante diana en el desarrollo de terapias anticancerígenas.

Podemos clasificarlos en cuatro grupos según su lugar de acción [26]:

- Extracelular: producción de factores de crecimiento

Muchos protooncogenes cifran proteínas que participan en cadenas moleculares de transmisión de señales estimuladoras del crecimiento. Esas señales se van transmitiendo desde el exterior celular hasta el interior de la célula.

El proceso comienza cuando una célula libera factores de crecimiento. Éstos se difunden por el espacio intercelular y se acoplan a receptores específicos que encuentran en la membrana exterior de las células cercanas.

Cuando un factor estimulador del crecimiento se une a un receptor, éste transmite una señal de proliferación a otras proteínas presentes en el citoplasma. Éstas, a su vez, emiten señales estimuladoras que se suceden en cascada hasta acabar en el núcleo. En el núcleo, los factores de transcripción responden activando a un conjunto de genes que son los que coadyuvan a que la célula entre en su ciclo de crecimiento.

Algunos oncogenes obligan a la célula a sobreproducir factores de crecimiento. Por ejemplo, el oncogén *Sis* (virus del sarcoma de simio) que codifica el factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF) [29]. También los sarcomas y gliomas liberan este factor en exceso. Otros tipos de cánceres secretan en exceso factor de crecimiento transformante de tipo alfa (TGF- α).

- Membrana: receptores de factores de crecimiento

Se han identificado versiones oncogénicas de genes de receptores de factores de crecimiento. Los receptores determinados por esos oncogenes liberan en el citoplasma celular un torrente de señales proliferativas aun en ausencia de factores de crecimiento en el exterior.

Por ejemplo, la familia de genes Erb-B que codifican para los receptores quinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El receptor de tipo Erb-B2 (también conocido como Her2/neu) se encuentra sobreexpresado en aproximadamente 20-25% de los cánceres de mama [30] y es uno de los causantes de que se produzca recurrencia del cáncer 2-3 años después de la intervención quirúrgica [31]. Por otra parte, el receptor Erb-B1 o EGFR se encuentra sobreexpresado en un 70% los cánceres de ovario y está asociado a un estado avanzado de la enfermedad, diagnóstico desfavorable y quimiorresistencia [32].

- Citoplasma: cascadas de señalización constitutivas

Otros oncogenes perturban la cascada de señales en algún punto del citoplasma.

Un ejemplo es la familia de oncogenes Ras, que se encuentran mutados en más del 30% de los tumores humanos [3].

Las proteínas que cifran los oncogenes Ras normales transmiten señales estimuladoras, procedentes de los receptores de factores de crecimiento, a otras proteínas situadas curso abajo en la cascada. Las proteínas cifradas por los genes Ras mutantes, sin embargo, están siempre activas, aunque los receptores de los factores de crecimiento no les estén enviando señales.

El proceso normal comienza cuando un factor de crecimiento se une a un receptor de factor de crecimiento, que como consecuencia se autofosforila en la porción citoplasmática y se produce la activación de un factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF), que se une al complejo Ras-GDP (inactivo) liberando el guanósín difosfato. Dado que el guanósín trifosfato (GTP) está presente en las células en mayor concentración que el GDP, las moléculas de Ras libres se unirán a este, siendo el complejo Ras-GTP la forma activa. Éste manda las señales a través de una cascada de fosforilaciones que culminan con la activación de factores de transcripción que estimulan la expresión de genes cuyos productos activan la proliferación celular. Una vez Ras envía las señales, hidroliza el GTP a GDP y se vuelve inactiva.

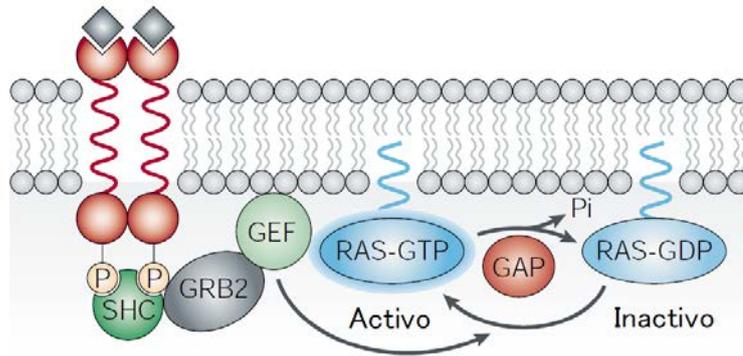


Figura 1.6 Señalización de Ras

Adaptado de Downward J. (2002) *Targeting RAS signalling pathways in 32roble therapy* [33]

En su forma mutada, el oncogén impide a la proteína Ras hidrolizar la molécula de GTP, por lo que siempre se mantiene en su forma activa, estimulando constantemente a la célula a dividirse.

Otro ejemplos son el oncogén Raf, que codifica la proteína B-Raf serina-treonina quinasa o el oncogén Src que codifica la proteína Src tirosina quinasa.

- Núcleo: factores de transcripción

También se producen oncogenes que alteran la actividad de los factores de transcripción nucleares.

Es el caso de la familia de factores de transcripción Myc. Normalmente, las células sólo producen Myc cuando son estimuladas mediante factores de crecimiento, y una vez producidos estimulan la transcripción de genes que activan la proliferación celular; sin embargo, en muchos tipos de cáncer (sobre todo en los asociados con los tejidos hematopoyéticos), los niveles de Myc permanecen elevados aún en ausencia de factores de crecimiento [26].

Otros ejemplos de oncogenes que codifican para factores de transcripción son fos y jun. Las proteínas de c-fos y c-jun dimerizan para formar el factor de transcripción AP-1 y están implicados en diversas cascadas de transducción de señales relacionadas con el crecimiento, la diferenciación celular, la excitación neuronal y el estrés celular. La expresión continuada de fos o jun puede llevar a la transformación de fibroblastos en cultivo y a la inducción de tumores murinos [34].

Otros ejemplos de oncogenes: La proteína codificada por el protooncogén Bcl-2 bloquea el suicidio celular, el oncogén Bcl-2 se encuentra implicado en linfomas de células B. A su vez el gen Bcl-1 codifica la ciclina D1, un componente estimulador del reloj del ciclo celular. Su versión mutada se encuentra implicada en cánceres de mama, cabeza y garganta. Por su parte, Mdm2 cifra un antagonista de la proteína supresora de tumores p53. Su versión oncogénica se encuentra implicada en sarcomas y otros tumores [26].

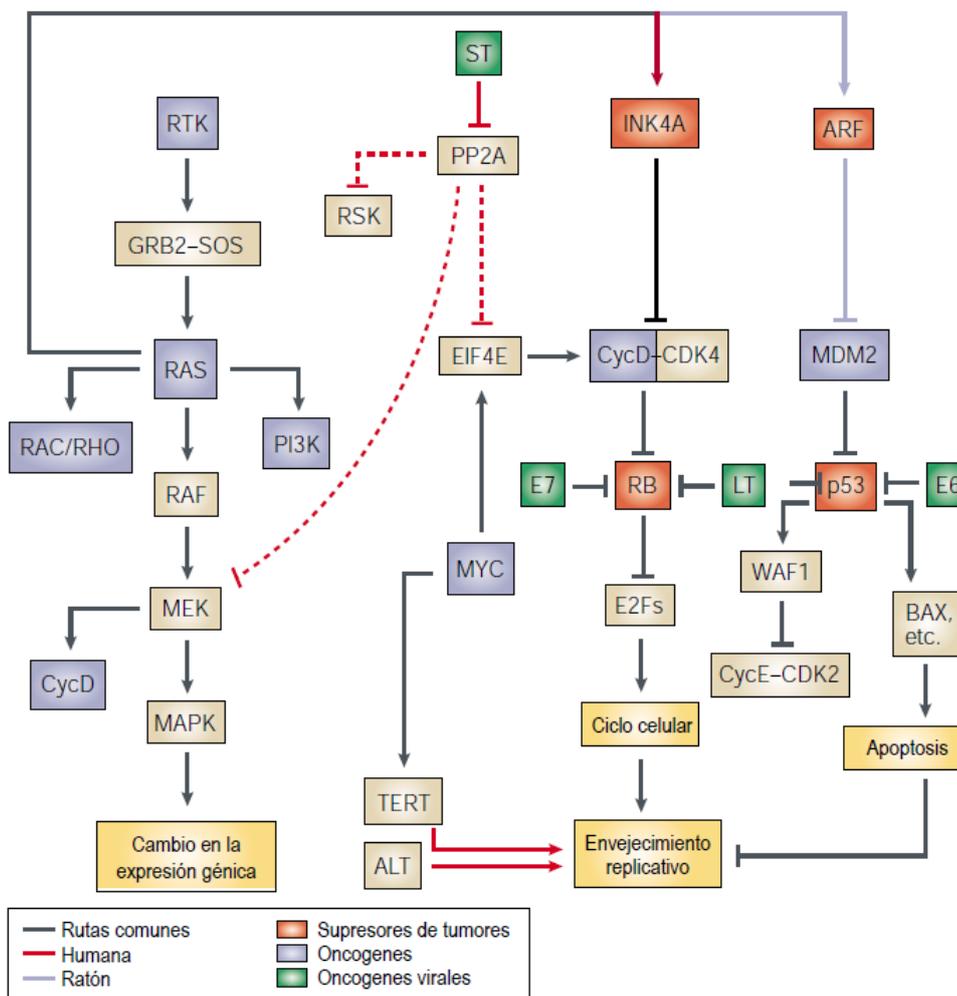


Figura I.7 Circuito molecular del cáncer

Adaptado de Hahn W.C. y Weinberg R.A. (2002) *Modelling the molecular circuitry of cancer* [24]

I.1.2.1.b Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores (TSGs), por su parte, inhiben la proliferación celular. Son genes cuyos productos normalmente regulan los puntos de control o inician el proceso de apoptosis.

En las células normales, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen el progreso a través del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN o a señales de inhibición del crecimiento desde el medio extracelular. Cuando los TSGs están mutados o silenciados, las células no pueden responder de forma normal a los puntos de control del ciclo celular, o no pueden someterse a la muerte celular programada si el daño en el ADN es muy amplio.

La mayoría de las mutaciones de pérdida de función que se producen en los TSGs son recesivas, esto implica que para que la célula pueda volverse cancerígena, los dos alelos del gen deben estar mutados. Esta hipótesis conocida como "Hipótesis de doble impacto" fue postulada por el genetista Alfred

Knudson en 1971 [35] como resultado de sus estudios con sobre el retinoblastoma, un tipo de tumor infantil (en algunos casos hereditario) que se genera en la retina debido a una mutación en proteína Rb, codificada por el gen Rb1.

En su estudio observó dos tipos de retinoblastoma: una forma bilateral hereditaria (aparecen tumores independientes en los dos ojos) y una forma unilateral no hereditaria (aparece sólo un tumor en uno de los ojos). En la forma hereditaria, los individuos poseen uno de los dos alelos mutados, por lo que el retinoblastoma se desarrolla a edades más tempranas, y con frecuencia desarrollan otros tumores, principalmente sarcomas [36], [37]. En la forma esporádica, deben producirse dos mutaciones independientes en las dos copias del gen durante los primeros años de vida (las células de la retina se dividen hasta los siete años) [38].

En la teoría del doble impacto ideada por Knudson el primer impacto de una mutación heredada está presente en todas las células de un individuo (línea germinal) a través del alelo defectuoso. El segundo impacto se produce cuando el alelo de tipo silvestre (normal) sufre una mutación espontánea en el interior de un órgano específico y esta mutación puede ser diferente de la del alelo afectado primariamente [39].

Se han identificado cuatro mecanismos de inactivación de Rb1: a) la inactivación genética debido a una mutación, provocando la liberación de los factores asociados; b) secuestro de la proteína Rb1 (o pRb) codificada por oncoproteínas virales; c) fosforilación de las proteínas Rb1 codificadas, la cual está catalizada por las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) durante la progresión del ciclo celular; d) degradación de pRb por caspasas en respuesta a estímulos apoptóticos. En todos los casos, la inactivación de Rb1 favorece la proliferación celular ya que se activan los genes regulados por E2F. Es interesante mencionar que la inactivación de Rb1 por mutación, secuestro o degradación ha sido asociada con aumento de apoptosis [40].

La mutación de Rb es una de las más frecuentes. Se encuentra, entre otros, en carcinomas de pulmón, mama, vejiga, próstata, esófago, de cuello uterino y algunas leucemias [38].

Otro gen supresor de gran importancia es el p53 o TP53. El gen p53 es uno de los más frecuentemente mutados en la mayoría de los tumores humanos, se calcula que aproximadamente en un 50%. Este gen, también conocido como el "guardián del genoma", desempeña un papel importante en la reparación del ADN, control del ciclo celular, senescencia y apoptosis [41]. La respuesta de p53 frente a estímulos de estrés es crucial para prevenir la formación de tumores [42].

El papel de p53 en el cáncer se hizo patente con el descubrimiento en 1989 de deleciones y mutaciones de p53 en cánceres de colon por Bert Vogelstein y colaboradores. Posteriormente, se han ido describiendo frecuentes mutaciones que causaban la inactividad de uno de los alelos en una extensísima variedad de tumores humanos: pulmón, mama, hígado, ovario, vejiga, cerebrales, estómago, esófago, sarcomas, linfomas y leucemias. Fue también decisivo el descubrimiento de la transmisión de mutaciones de p53 en individuos con la enfermedad de Li-Fraumeni, que heredan un alelo mutado y son muy susceptibles a numerosos cánceres como consecuencia de la mutación del segundo alelo de p53 [38].

En algunos tumores, sin embargo, no es la proteína p53 la afectada, sino alguna de las implicadas en su estabilización o alguna de las efectoras. En la regulación de la estabilidad de p53 desempeña una función clave la proteína Mdm2, que opera como una ubiquitín-ligasa de p53 [43]. El gen Mdm2 ha sido identificado como oncogén que sobreexpresado o amplificado tiene un elevado potencial tumorigénico [42] y se encuentra implicado en sarcomas y otros tumores.

La proteína Mdm2 media la ubiquitinación de la proteína p53 y permite que el proteosoma la reconozca y degrade, disminuyendo los niveles de p53 en la célula. La proteína ARF se une a Mdm2, bloqueándola en el nucléolo, e impide la degradación de p53, de modo que p53 queda activa y estabilizada. Cuando la actividad de Mdm2 es inhibida, se separa de p53 y los niveles de p53 en el núcleo aumentan rápidamente. La proteína p53 activa actúa como factor de transcripción, estimulando la expresión del gen Mdm2. A medida que los niveles de Mdm2 aumentan, se vuelve a formar la unión con p53, volviendo a la inactivación y degradación de p53 y continuando con la retroalimentación del ciclo.

La inhibición de Mdm2 puede producirse por distintos factores de estrés celular, por daños al ADN, hipoxia, ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el óxido nítrico (NO). También cuando la proteína ARF es inducida mediante estímulos oncogénicos debido a la activación de E2F, Ras o Myc.

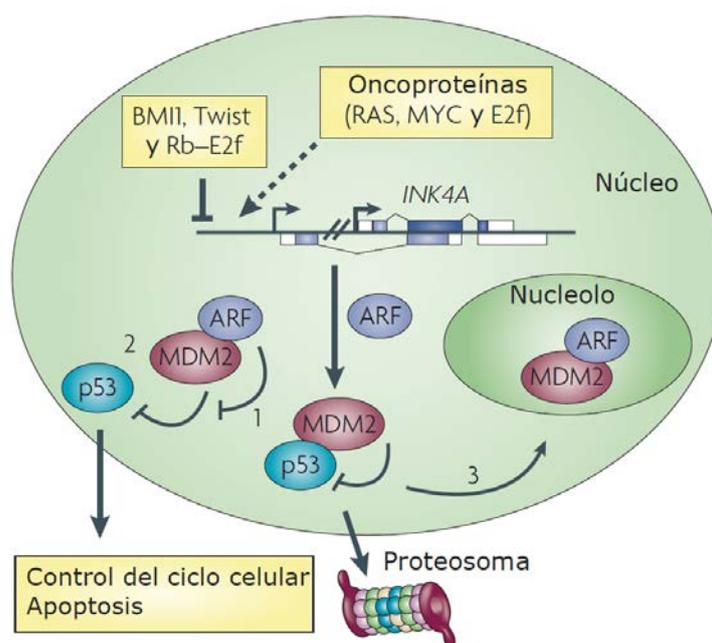


Figura 1.8 Inducción de p53 por ARF

Adaptado de Meek D. W. (2009) *Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?* [44]

Además del retinoblastoma, existe una predisposición hereditaria similar para otros cánceres asociada con mutaciones heredadas en TSGs. Por ejemplo, las personas que heredan una mutación en la línea germinal en un alelo APC, desarrollan pólipos intestinales precancerosos y padecen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon antes de los 50 años.

A su vez, las mujeres que heredan un alelo mutante de BRCA1 tienen un 60% de probabilidad de desarrollar cáncer de mama antes de los 50 años. En las mujeres con cáncer de mama hereditario, la

pérdida del segundo alelo BRCA 1, junto con otras mutaciones, es necesaria para que una célula normal de los conductos mamarios se transforme en maligna. Sin embargo, BRCA1 generalmente no se encuentra mutado en el cáncer de mama esporádico no hereditario. [29]

I.1.2.1.c Epigenética del cancer

Como hemos comentado anteriormente, el término epigenética alude a todas las alteraciones de la expresión génica que son heredables pero no debidas a cambios en la secuencia de ADN, por lo que pueden estar presentes en las células somáticas o de línea germinal. Las modificaciones epigenéticas más frecuentes son la metilación del ADN y las modificaciones covalentes en las histonas [4], [45]. Los patrones genómicos y la localización de estas modificaciones pueden afectar a la expresión génica.

El punto de control de expresión génica mejor conocido y más importante en eucariotas es el inicio de la transcripción. El inicio de la transcripción de un gen comienza con la unión de factores de transcripción activadores a secuencias reguladoras específicas situadas 5' del sitio de iniciación de la transcripción [46]. Para que esto suceda, es necesario que la cromatina de esa región esté relativamente descondensada, de modo que los factores puedan acceder.

- **Modificaciones en las histonas**

Las modificaciones de las histonas alteran la estructura de la cromatina, haciendo a los genes accesibles o inaccesibles para la transcripción. Esto se produce debido a que las colas N-terminales de las histonas tienen una serie de aminoácidos (lisinas y serinas, principalmente) que pueden sufrir modificaciones covalentes del tipo acetilación, metilación o fosforilación, permitiendo una descondensación parcial y por tanto el acceso de los factores de transcripción [47].

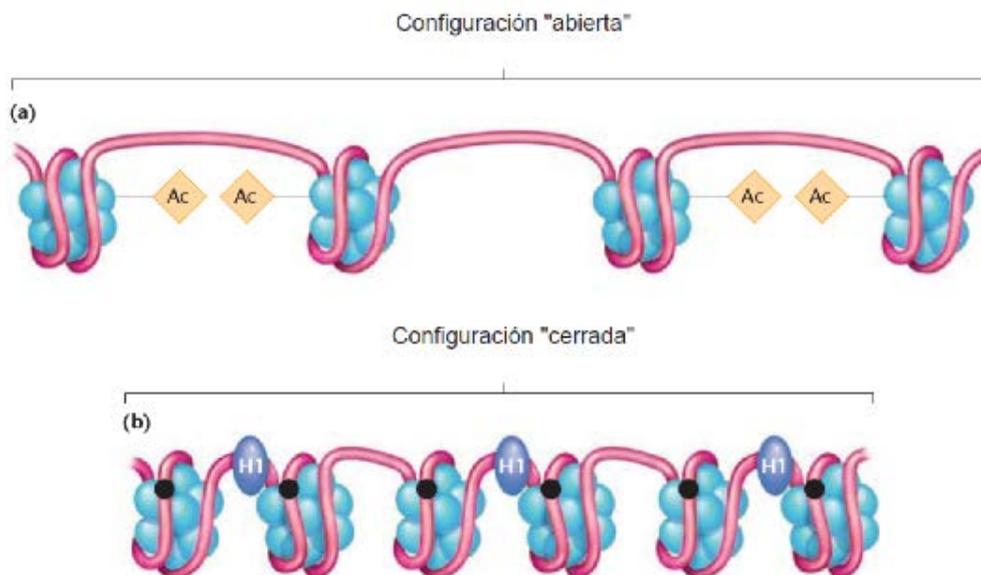


Figura I.9 Modificaciones en las histonas
Adaptado de Klug W. et al. (2012) *Concepts of genetics* [4]

Cuando las histonas se modifican por acetilación, reacción catalizada por las enzimas histona acetiltransferasas (HAT), la estructura de la cromatina se “abre”, permitiendo que los genes de esos nucleosomas estén disponibles para la transcripción. Esta reacción puede revertirse mediante las enzimas histona deacetilasas (HDAC), cambiando la cromatina a la posición “cerrada” y silenciando los genes de modo que sean inaccesibles para la transcripción [4].

Las modificaciones por fosforilación y metilación actúan en coordinación con la acetilación estableciendo el código de histonas, lo que llevará a que una región se comporte como eucromatina (poco condensada y transcripcionalmente más activa) o heterocromatina (más condensada, por lo que sus genes tienen un bajo nivel de expresión).

Las alteraciones en los patrones de modificación de las histonas tienen el potencial de afectar a la estructura e integridad del genoma y a la expresión génica. Los genes que codifican las enzimas histona acetilasas, deacetilasas, metiltransferasas y desmetilasas se encuentran con frecuencia mutados o expresados anormalmente en las células cancerígenas.

Algunos ejemplos son: el gen AIB1, que se encuentra amplificado en cáncer de mama; el co-activador transcripcional CBP que está fusionado con el gen MOZ o con el gen MLL en pacientes con leucemia mieloide aguda; esta fusión hace que la actividad acetilasa esté aumentada en determinadas células de la médula ósea y esto desencadena la leucemia. Por último, la proteína p300, otro co-activador transcripcional, se encuentra mutado en el cáncer colorrectal y delecionado en el 80% de los glioblastomas. Estos tres genes presentan actividad acetilasa de histonas [47].

- **Metilación del ADN**

La metilación del ADN cumple funciones críticas en el control de la actividad génica y en la arquitectura del núcleo de las células normales. Se produce en el carbono 5 (C5) de la citosinas que preceden a las guaninas. Estos dinucleótidos, denominados CpG, no están distribuidos homogéneamente a lo largo del genoma, sino que son más abundantes en los genes, tanto en los exones como, sobre todo, alrededor del inicio de la transcripción.

Los dinucleótidos CpG metilados están distribuidos a lo largo de la secuencia de genes, mientras que los dinucleótidos CpG no metilados tienden a concentrarse en regiones que se denominan islas CpG. Se estima que alrededor del 90% de las islas CpG se encuentran no-metiladas en células somáticas normales [35], [36], [40].

De hecho, el análisis de todos los promotores del genoma humano identifica dos tipos de genes: los que tienen un promotor con un porcentaje normalizado de CpG en torno al 0,61 y los que tienen un promotor con un porcentaje normalizado de CpG en torno al 0,23. El porcentaje normalizado se define como la frecuencia observada dividido por la probabilidad esperada de encontrar ese elemento.

Los primeros constituyen un 70% de todos los promotores, y corresponden a los genes constitutivos (“housekeeping” en inglés). Por el contrario, los promotores con bajo porcentaje normalizado de CpG constituyen un 30% y corresponden a los genes que se expresan en tejidos específicos. Los promotores que contienen una isla CpG están habitualmente hipometilados en la línea germinal, lo cual les protege frente a las transiciones C-T que sufren las citosinas metiladas. Por ejemplo, el 30% de las mutaciones encontradas en tumores en el gen supresor TP53 son transiciones C-T.

Se cree que la metilación del ADN es responsable del silenciamiento de los genes asociados con la impronta genética, la represión génica (heterocromatina) y la inactivación del cromosoma X en mujeres.

La impronta genética es el proceso de regulación epigenética por el cual los genomas materno y paterno se hacen distinguibles uno de otro como resultado de una metilación diferencial específica del genoma de cada uno de los gametos. El establecimiento de estos patrones de metilación en los gametos provoca que, tras la fecundación, ciertos genes puedan ser activos en uno de los cromosomas parentales, pero no en el otro. Como consecuencia, puede existir un único alelo activo para el gen con impronta [48], [49]. La pérdida de impronta da lugar al desarrollo de diversas patologías, por lo que el entendimiento de los mecanismos que regulan la impronta genómica tiene una importancia creciente a nivel clínico y diagnóstico.

Dos anomalías caracterizan la metilación del ADN en el cáncer: la hipometilación global y la hipermetilación de las islas CpG de los genes supresores de tumores.

En las células normales, las secuencias repetitivas del ADN están metiladas para prevenir la inestabilidad genómica y la iniciación de la transcripción en sitios incorrectos. Además, los transposones (elementos móviles del genoma) no pueden activarse en un ambiente metilado.

La hipometilación del ADN revierte la inactivación de genes, permitiendo la transcripción de varios grupos de genes incluyendo los oncogenes (por ejemplo el oncogén Bcl-2, ras o PAX2). También relaja el control sobre los genes improntados, de modo que las células pueden adquirir nuevas propiedades de crecimiento. La hipometilación de las secuencias repetitivas del ADN en regiones heterocromáticas está asociada con un aumento de las reorganizaciones cromosómicas y de las aneuploidías.

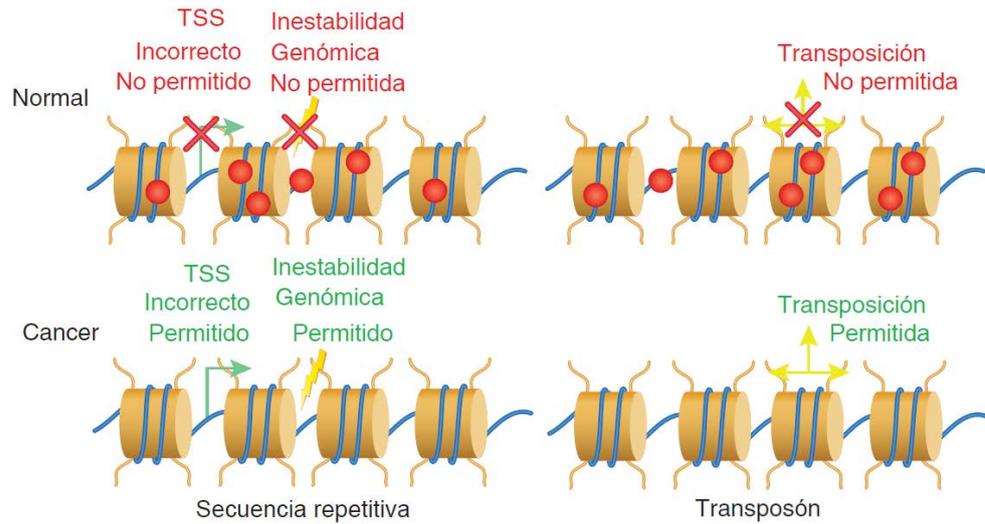


Figura I.10 Hipometilación del ADN
Adaptado de Rodríguez-Paredes M y Esteller M. (2011)
Cancer epigenetics reaches mainstream oncology [40]

Por otra parte, se produce la hipermetilación de genes supresores de tumores en islas CpG que normalmente no están metiladas. Esto puede provocar el silenciamiento de los mismos o la disminución de su expresión. Los perfiles de hipermetilación de las islas CpG son específicos para cada tipo de cáncer.

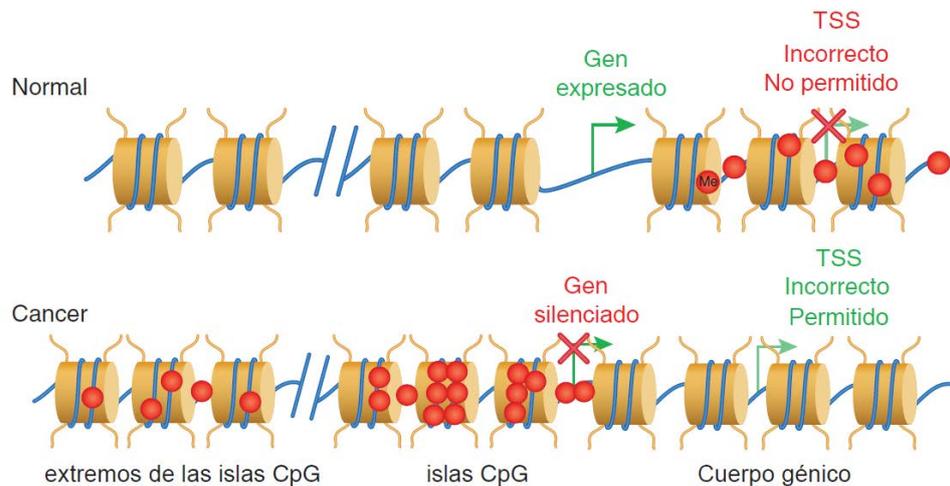


Figura I.11 Hipermetilación de genes supresores de tumores
Adaptado de Rodríguez-Paredes M y Esteller M. (2011)
Cancer epigenetics reaches mainstream oncology [40]

En las células normales, las islas CpG y sus extremos permanecen no-metilados, por lo que la cromatina se encuentra en posición "abierta" y permite la transcripción. Además, la metilación del ADN en el cuerpo génico evita que se realice la transcripción en sitios de iniciación (TSS) incorrectos. Por el contrario, en las células tumorales las islas CpG están hipermetiladas,

así como sus extremos, pero el cuerpo génico se encuentra desmetilado, permitiendo la transcripción en lugares de iniciación incorrectos.

El estudio de la metilación del ADN y de los patrones de modificación de las histonas asociado al desarrollo y progresión del cáncer tiene un potencial uso clínico. Los genes hipermetilados se encuentran bajo estudio como posibles marcadores de diagnóstico, pronóstico y predicción de respuesta al tratamiento. También abre la posibilidad de reactivarlos para revertir el fenotipo neoplásico.

Un ejemplo es el gen GSTP1 codifica la enzima glutación-S-transferasa (GST). La GST es una enzima de detoxificación de un amplio rango de xenobióticos, que cataliza la conjugación del glutación endógeno (GSH) con compuestos electrófilos u oxidantes (algunos de ellos carcinógenos). La conjugación incrementa la solubilidad del compuesto facilitando su excreción. El silenciamiento del GSTP1 impediría la detoxificación y por tanto se producirían daños celulares, como la peroxidación lipídica y daños en el ADN.

El gen de la glutación S-transferasa pi 1 (GSTP1) se encuentra hipermetilado en el 80-90% de los pacientes con cáncer de próstata y en un 70% de las neoplasias intraepiteliales prostáticas (PIN), pero no en el tejido de la hiperplasia prostática benigna (HPB) [45], [50]. Estos hallazgos permiten plantear la hipótesis de que la inactivación de la enzima GSTP1 es uno de los primeros cambios que promueven la inestabilidad y transformación neoplásica de la célula prostática. Puede detectarse tanto en tejido como en fluidos biológicos [51].

Harden et al. (2003) estudiaron la hipermetilación del GSTP1 en muestras de tejido de próstata procedentes de biopsia mediante PCR cuantitativa. 29 pacientes pudieron ser evaluados con este método. Se detectó metilación del GSTP1 en 11 de 15 casos con cáncer de próstata y no se detectó metilación en ninguno de los 14 pacientes que no fueron diagnosticados con cáncer de próstata. La sensibilidad fue del 73% y la especificidad del 100%. El valor predictivo positivo fue del 100% y el negativo del 78%. La cuantificación de la hipermetilación resultó precisa incluso en muestras con poco tejido, por lo que la metilación del GSTP1 puede considerarse como un marcador útil en la detección del cáncer de próstata [52], [53].

Otros ejemplos de genes supresores inactivados por hipermetilación son: el gen del retinoblastoma (RB), p16INK4a, MLH1 (presente en cánceres de colon, estómago y endometrio) o BRCA1 (presente en cánceres de mama y ovario).

- **Factores epigenéticos y miARN**

El ARN no codificante está alcanzando un papel cada vez más importante en la biología. Los miARN son genes cortos (22 nucleótidos) que no se traducen y que hibridizan con mARNs silenciando su traducción. Los patrones de expresión de los miARNs están fuertemente regulados y juegan un papel importante en la proliferación celular, apoptosis y diferenciación. Los miARNs pueden estar hipoexpresados en cáncer por hipermetilación de sus reguladores en el extremo 5' y tienen función de supresión de tumores. Por ejemplo, una disminución en la

expresión de los let-7 y miR-15/miR-16 activan a los oncogenes Ras y Bcl-2, respectivamente, mientras que el silenciamiento epigenético del miR-124^a activa el oncogen CDK6 en varios tumores [45].

Los perfiles de metilación en las células cancerígenas se están utilizando como herramienta de ayuda en el diagnóstico de los tumores y en la predicción de su curso. El conocimiento de estos procesos epigenéticos es una de las posibles bases para el desarrollo del tratamiento del cáncer, mediante la reversión del mecanismo alterado. [54]–[56]

I.1.2.2 Angiogénesis

La angiogénesis constituye un proceso importante en la progresión del cáncer, por lo que su inhibición se presenta como una valiosa herramienta en la terapia contra cáncer.

Además de éste, hay un elevado número de enfermedades caracterizadas por alteraciones del proceso angiogénico, ya sea debido a su insuficiencia (como insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares o úlceras) o a su exceso (retinopatía diabética, degeneración macular, inflamaciones crónicas o endometriosis). Todos estos procesos podrían beneficiarse de la modulación terapéutica de la angiogénesis [57].

Los tumores vasculares están muy restringidos en su potencial proliferativo debido a la falta de suministro de sangre. Para que un tumor desarrolle su tamaño y su potencial metastático tiene que realizar un “cambio angiogénico” mediante la alteración del equilibrio local de factores proangiogénicos (estimuladores) y antiangiogénicos (inhibidores) [58].

I.1.2.2.a El cambio angiogénico

El cambio angiogénico puede producirse en diferentes etapas de la progresión tumoral, dependiendo de la naturaleza del tumor y de su microambiente [59]. Su activación puede producirse principalmente por hipoxia, pero existen otros factores como la acidosis y la inflamación. También es importante la base genética del huésped, ya que como hemos explicado anteriormente, pueden ocurrir mutaciones genéticas con activación de protooncogenes (bcl-2, K-ras, H-ras, c-myc, etc.) e inhibición de genes supresores de tumores (p53), que amplifican la expresión de factores proangiogénicos [57], [60].

Como hemos comentado anteriormente, la angiogénesis es un proceso normal que se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario, en los órganos que se encuentran en crecimiento, en el aparato reproductor femenino (en la formación del revestimiento del útero en el proceso de ovulación y en la formación de la placenta) y en la reparación de tejidos.

La diferencia entre la angiogénesis normal y la tumoral es que durante la primera, los nuevos vasos maduran rápidamente y se estabilizan (estado quiescente), mientras que los vasos tumorales continúan estimulando el crecimiento de nuevos vasos.

Además, los vasos tumorales son diferentes de los normales, poseen estructura y organización irregulares, se encuentran dilatados y son permeables y hemorrágicos, en parte debido a la

sobreproducción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y a la menor abundancia en células perivasculares, que se encuentran en estrecho contacto con las células endoteliales. Como consecuencia, el flujo que se genera en dichos vasos es mayoritariamente caótico y la sangre que contienen está poco oxigenada [59], [61].

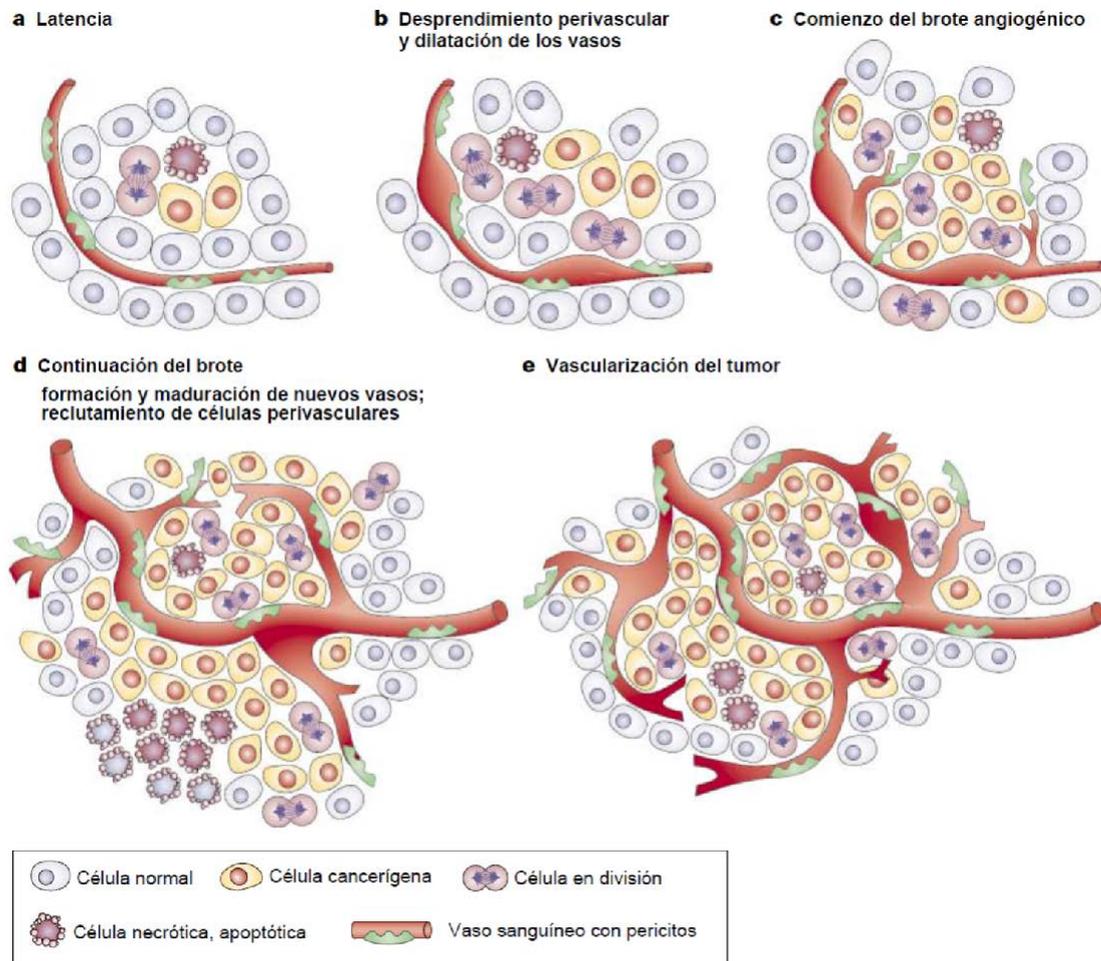


Figura 1.12 Cambio angiogénico

Adaptado de Bergers G. y Benjamin L. E. (2003) *Tumorigenesis and the angiogenic switch* [59]

La angiogénesis tumoral se divide en dos fases separadas por el cambio angiogénico. La primera es una fase avascular, en la que los tumores no miden más de 1–2 mm de diámetro. Estos tumores permanecen ocultos alcanzando un estado de equilibrio entre proliferación y apoptosis. De hecho, pueden no llegar a entrar nunca en la segunda fase, en la que se produce un crecimiento exponencial del tumor. Las metástasis ocultas constituyen un problema clínico ya que en ocasiones se activan tras la extracción del tumor primario.

La hipoxia es un estímulo importante para el crecimiento fisiológico y patológico de los vasos sanguíneos. Cuando los tejidos necesitan más oxígeno del disponible, la hipoxia desencadena el crecimiento de nuevos vasos por señalización a través de factores de transcripción inducibles por hipoxia que regulan positiva y negativamente la expresión de factores proangiogénicos y antiangiogénicos,

respectivamente. También es un factor atrayente de macrófagos; la presencia de células pro-inflamatorias aumenta la liberación de factores de crecimiento [62], [63].

La hipoxia induce la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de VEGF y las angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 que interactúan con las proteasas de la matriz extracelular (MEC) produciéndose una vasodilatación de los vasos preexistentes (capilares y vénulas) y un aumento de la permeabilidad de la pared.

Posteriormente, mediante la acción de diversas enzimas proteolíticas denominadas metaloproteasas (MMP), se produce la degradación de la membrana basal y su rotura. Esto permite a las células endoteliales migrar y proliferar para formar los nuevos brotes capilares que penetran entre las redes de las células tumorales en crecimiento.

La migración está guiada principalmente por el VEGF, las angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Además contribuyen otras citoquinas [64] como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleucina-8 (IL-8) y moléculas señalizadoras como las efrinas, semaforinas y netrinas.

Las células endoteliales migradas se alinean en cordones y brotes sueltos formando una luz entre el brote de avance. Cuando todos los brotes se conectan se restablece el flujo. El subsiguiente aumento de oxígeno disminuye la expresión de VEGF, reduciendo la proliferación de células endoteliales.

La maduración del nuevo vaso va acompañada de un aumento en la expresión de factores antiangiogénicos, muchos liberados como resultado de la proteólisis, como trombospondina-1 (TSP-1), la endostatina y la angiostatina entre otros.

La trombospondina 1 (TSP-1) inhibe la angiogénesis y promueve la apoptosis de la célula endotelial a través de un aumento de la expresión de Bax y una disminución de Bcl-2 y de la vía de las caspasas. Por su parte, la endostatina inhibe la migración de la célula endotelial e induce su apoptosis; para ello, se une al receptor KDR/Flk-1 e interfiere en el mecanismo de señal del VEGF. Por último, la angiostatina inhibe la neovascularización y el crecimiento de la metástasis [57].

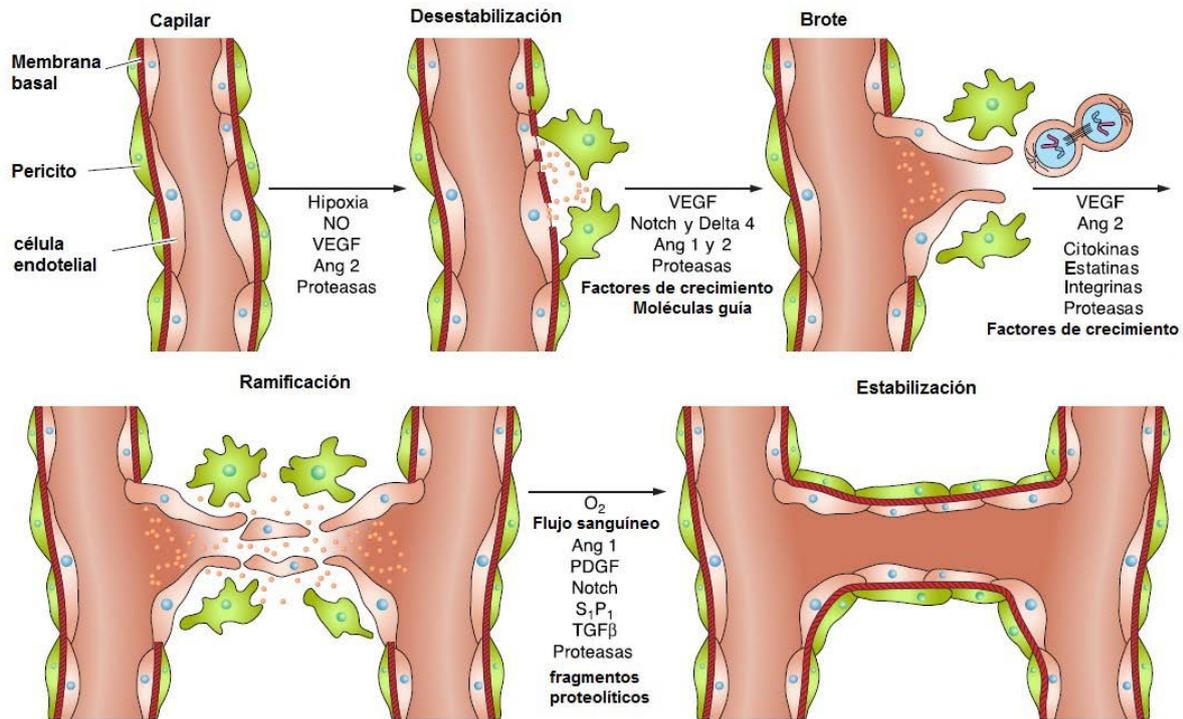


Figura I.13 Formación de nuevos vasos sanguíneos

Adaptado de Clapp, C. et al. (2009) *Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis* [63]

Tabla I-1 Factores reguladores de la angiogénesis

Mauriz J. L. et al. (2005) *Tratamiento antiangiogénico del cáncer* [57]

Factores proangiogénicos		Factores antiangiogénicos	
Factor	Función biológica	Factor	Función biológica
VEGF	↑ permeabilidad, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ colagenasas intersticiales, proliferación y migración de las CE, ↓ apoptosis CE	Angiostatina	↓ proliferación y migración CE, ↓ formación tubo vascular, ↑ apoptosis CE
FGF	↑ proliferación y migración de las CE, ↑ activadores del plasminógeno, ↑ integrinas $\alpha_3\beta_3$ y otras moléculas de adhesión	Endostatina	↓ proliferación y migración CE, ↑ apoptosis CE
Ang-1	Formación de los brotes vasculares y estabilización de los vasos	Ang-2	Desestabilización de los vasos, ↑ apoptosis CE
Ang-2	↑ proliferación y migración de las CE, formación de los brotes vasculares en presencia del VEGF	TGF β	↓ proliferación y migración CE, ↓ activadores del plasminógeno, ↑ TIMP, ↑ apoptosis CE
PDGF	Estabilización de los vasos	TNF α	Inhibición de la proliferación de la CE inducida por el FGF, ↑ apoptosis CE
TGF β	Estabilización de los vasos	TSP-1 y TSP-2	↓ migración y ↑ apoptosis CE
TNF α	Migración CE	MMP	Generación de angiostatina
EGF	Proliferación CE	PEDF	↓ proliferación, migración CE
CSFs	Proliferación y migración CE		
Angiogenina	Proliferación CE		
Angiotropina	Migración CE, formación del tubo		
IGF-1	Proliferación CE, ↓ apoptosis CE, inducción del VEGF, ↑ activadores del plasminógeno		
HGF	Proliferación y migración CE		
PECAM-1	Agregación CE, formación tubo, migración CE, estabilización tubo, angiogénesis inducida por FGF		
Integrinas	Adhesión CE, migración CE, ↓ apoptosis CE, angiogénesis inducida por FGF		
Óxido nítrico	↑ permeabilidad, proliferación CE, liberación FGF		

MMP: degradación de la matriz extracelular; MEC: matriz extracelular; FGF: factores de crecimiento de fibroblastos; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; CE: célula endotelial.

La neovascularización es generalmente un prerrequisito para la progresión tumoral. Sin embargo, existen algunos tipos de tumor que no requieren de este paso. Como los astrocitomas, en los que las células tumorales proliferan a lo largo de los vasos sanguíneos cerebrales y la angiogénesis sólo se produce cuando el tamaño del tumor alcanza grado IV (Glioblastoma multiforme). En este punto, el tumor se vuelve hipóxico y necrótico e incrementa la proliferación celular, induciendo la formación de nuevos vasos.

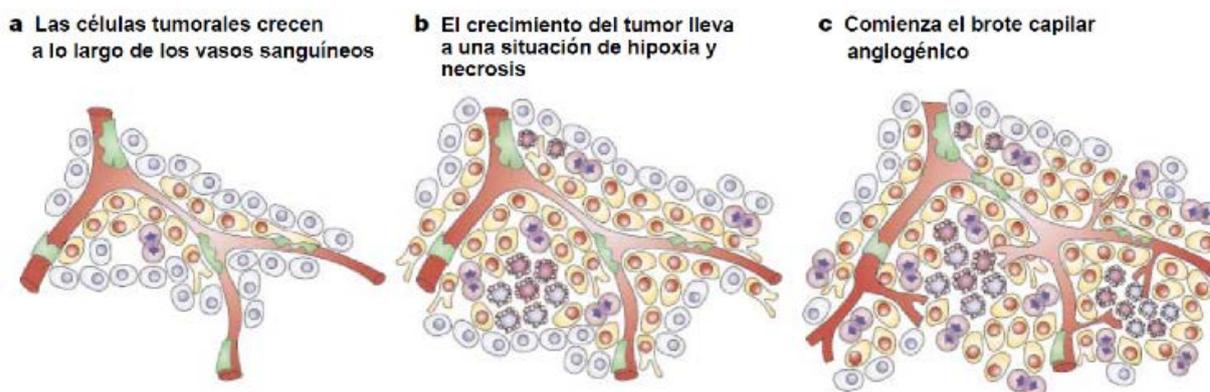


Figura I.14 Progresión de los astrocitomas

Adaptado de Bergers G. y Benjamin L. E. (2003) *Tumorigenesis and the angiogenic switch* [59]

I.1.2.2.b Inhibición de la angiogénesis como tratamiento contra el cáncer

Tradicionalmente, el tratamiento del cáncer (quimioterapia y radioterapia) se ha centrado en la célula tumoral. De este modo, cualquier fármaco o sustancia capaz de matar a las células tumorales *in vitro* era, por definición, un candidato para el tratamiento quimioterapéutico *in vivo* [57]. Pero la mayoría de los fármacos quimioterápicos se caracterizan por estar provistos de un amplio perfil de toxicidad y por la aparición de resistencia al tratamiento.

Puesto que la angiogénesis es fundamental para el desarrollo del tumor y la aparición de metastásis, las terapias antiangiogénicas han surgido como una alternativa o complemento de gran potencial a las terapias convencionales. El tratamiento antiangiogénico realiza la acción antitumoral de forma indirecta mediante la inhibición de la vascularización del tumor e impidiendo de esta forma que se le aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. De esta forma, el tratamiento no se centra únicamente en la célula cancerígena, sino también en su entorno y, sobre todo, en el proceso de formación de nuevos vasos. Además, las células endoteliales son estables genéticamente por lo que están menos predispuestas a acumular mutaciones que les permitan desarrollar resistencia al tratamiento [57], [65].

Otra de las ventajas de los fármacos antiangiogénicos es que pueden acceder fácilmente a las células endoteliales del tumor, a diferencia de los fármacos citostáticos, que tienen que penetrar en grandes masas tumorales. Además, producen mucha menor toxicidad que los tratamientos convencionales, su espectro de acción puede ser más amplio y son mucho más específicos [57].

Sin embargo, se ha demostrado que los tumores en los que el gen p53 está inactivado tienen una menor respuesta a los inhibidores angiogénicos. La pérdida de p53 aparentemente permite a las células tumorales sobrevivir mejor en condiciones de hipoxia, disminuyendo su dependencia del soporte vascular [66]. Además, las nuevas células endoteliales son estructural y funcionalmente anormales y se ha descrito que pueden adquirir alteraciones citogenéticas en el microambiente tumoral [67].

Además, la terapia antiangiogénica en la actualidad sólo permite prolongar la supervivencia del paciente unos meses. Tras un tiempo, el tumor retoma el crecimiento en algunos casos incluso de forma más agresiva [68], [69].

En este momento podemos destacar cuatro mecanismos de resistencia antiangiogénica [69], [70]:

- a) Los tumores producen diversos tipos de moléculas antiangiogénicas además del VEGF, como por ejemplo el factor de crecimiento placentario (PIGF), el FGF o IL-8. Al disminuir los niveles de VEGF se activan las vías de estas moléculas, resultando en un aumento en los niveles de las mismas.
- b) Las células tumorales amplifican los genes angiogénicos en su genoma, lo cual induce una mayor expresión génica, requiriendo potencialmente cantidades superiores de antiangiogénicos.
- c) Los tumores reclutan una mezcla heterogénea de células derivadas de la médula ósea que confieren resistencia mediante la secreción de potentes mediadores angiogénicos y linfangiogénicos como VEGF.
- d) Además de la vascularización a partir de vasos preexistentes, existen otros procesos de angiogénesis y remodelación vascular. Esto explica aún más la resistencia al bloqueo de VEGF [71]. Además de la angiogénesis por brotes vasculares, se puede dar por vasculogénesis (a partir de células precursoras de células endoteliales), intususcepción (división de los vasos preexistentes en dos nuevos vasos, mediante la formación de un tronco transvascular en el interior de la luz del vaso), co-opción vascular (las células tumorales crecen asociadas a microvasos preexistentes sin necesidad de una respuesta angiogénica), mimetismo vascular (las células tumorales son capaces de imitar a las células endoteliales y formar conductos vasculares complejos y ramificados, en los que se detecta la presencia de sangre) [72], [73]. Asimismo, en el tumor se observa la diferenciación de células endoteliales a partir de células madre tumorales (CSCs) que presentan una baja sensibilidad al bloqueo de VEGF [69].

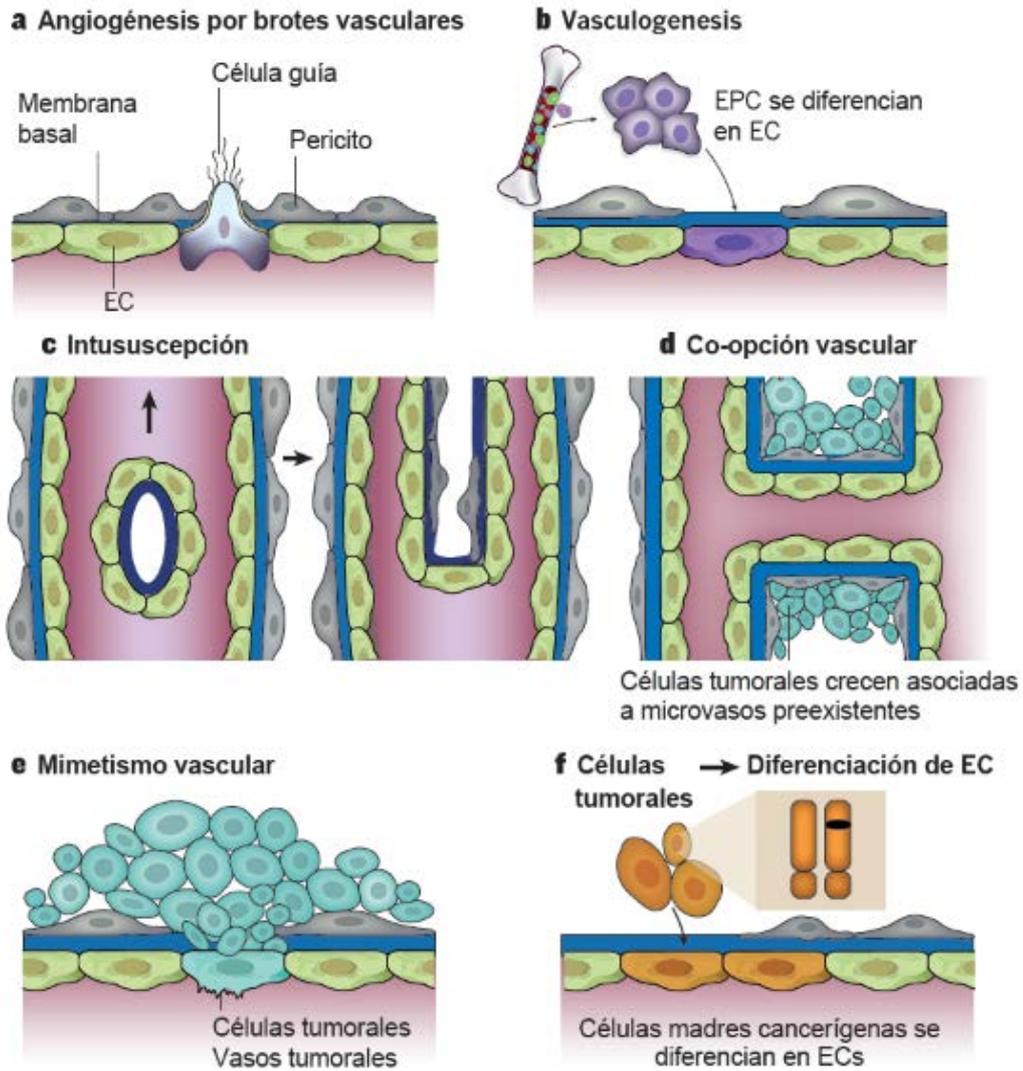


Figura I.15 Modos de formación de los vasos en la angiogénesis

Adaptado de Carmeliet P. y Jain R.K. (2011)

Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [71]

Los inhibidores del VEGF y de sus receptores son una de las dianas más habituales, pero existe un campo investigación muy amplio: inhibidores de PARP, de EGFR, de Cdk, etc [74]. Un mejor conocimiento del proceso de angiogénesis nos permitirá con el tiempo desarrollar terapias combinadas mucho más efectivas.

I.1.2.3 Invasión primaria

La invasión primaria constituye la etapa inicial del proceso metastásico y consiste en la migración activa de células tumorales desde su lugar de origen, a través de las matrices extracelulares, hasta alcanzar los vasos. Para ello, las células tumorales deben realizar la disolución de la membrana basal y la

progresión a través del estroma intersticial, en la que tienen un papel predominante las enzimas proteolíticas, fundamentalmente las metaloproteinasas.

Para explicar el paso de las células tumorales a través de la matriz, el grupo de Liotta propuso en 1983 un mecanismo en tres etapas [15], [75]:

- 1) Adhesión de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular
- 2) Degradación local de la matriz por enzimas proteolíticos
- 3) Locomoción de las células tumorales a través de la matriz modificada

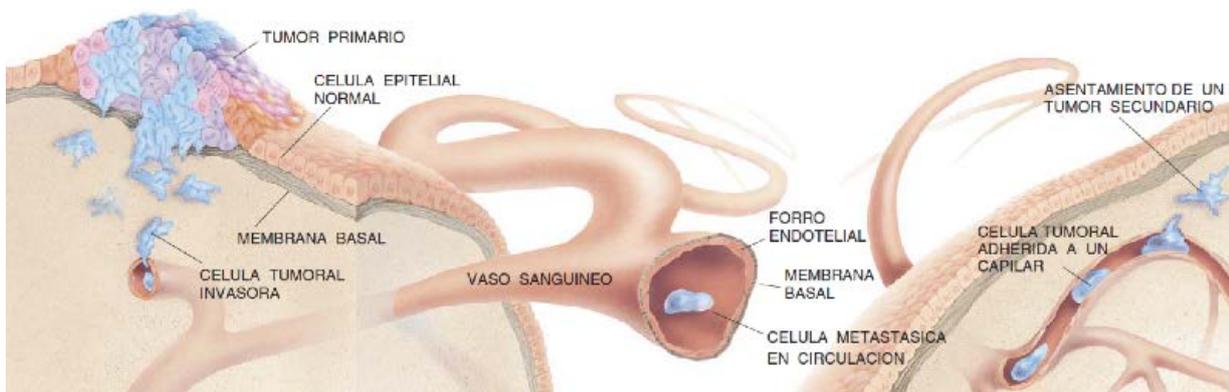


Figura 1.16 Propagación de las células tumorales
Adaptado de Ruoslahti E. (1992) *Así se propaga el cáncer* [76]

I.1.2.3.a Adhesión de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular

En tejidos normales, las células se adhieren entre sí (adhesión célula-célula) y a la matriz extracelular (adhesión célula-matriz). La matriz extracelular (MEC) consiste en una red insoluble de proteínas que se extiende sobre el espacio intercelular [29], [76].

La MEC asociada con las células epiteliales está organizada en diversas capas interconectadas en las cuales macromoléculas de la MEC se unen entre sí y con las células. La unión entre células se encuentra mediada por las moléculas de adhesión celular (CAM), mientras que las adhesiones célula-matriz vienen mediadas por los receptores de adhesión.

Existen cuatro grandes familias de CAM:

- Cadherinas: Grupo de glicoproteínas implicadas en la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} . Son las moléculas más importantes en las interacciones homotípicas célula-célula. Se denominan con el prefijo E, N o P en función del tipo de células donde se hallan principalmente. Así, la E-cadherina se encuentra en tejido epitelial, la N-cadherina en neuronas y la P-cadherina en tejido placentario [77]. La E-cadherina es esencial para el desarrollo y mantenimiento del tejido epitelial diferenciado durante el desarrollo embrionario [78].

- Inmunoglobulinas (Ig): Pueden formar interacciones tanto homotípicas como heterotípicas. Tienen uno o más dominios Ig y una de sus funciones principales es la defensa inmunológica actuando como anticuerpo. Sus uniones no son tan fuertes como las de las cadherinas y parece que actúan ajustando de forma más fina la asociación entre células de un mismo tejido [21].
- Integrinas: Son receptores de superficie que median la adhesión célula-matriz y también pueden mediar adhesiones célula-célula, en concreto con algunas moléculas de la familia de las Ig [79]. También participan en la transducción de señales, y así pueden influir en diferentes funciones celulares como la migración, la apoptosis, la diferenciación y la proliferación [80].
- Selectinas: Grupo de glicoproteínas implicadas en la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} . Son capaces de formar uniones heterotípicas con glucoproteínas. Su función principal está relacionada con las respuestas inflamatorias a la regulación del tráfico de los leucocitos; controlan la unión de los leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y facilitan la migración hacia los tejidos circundantes [21].

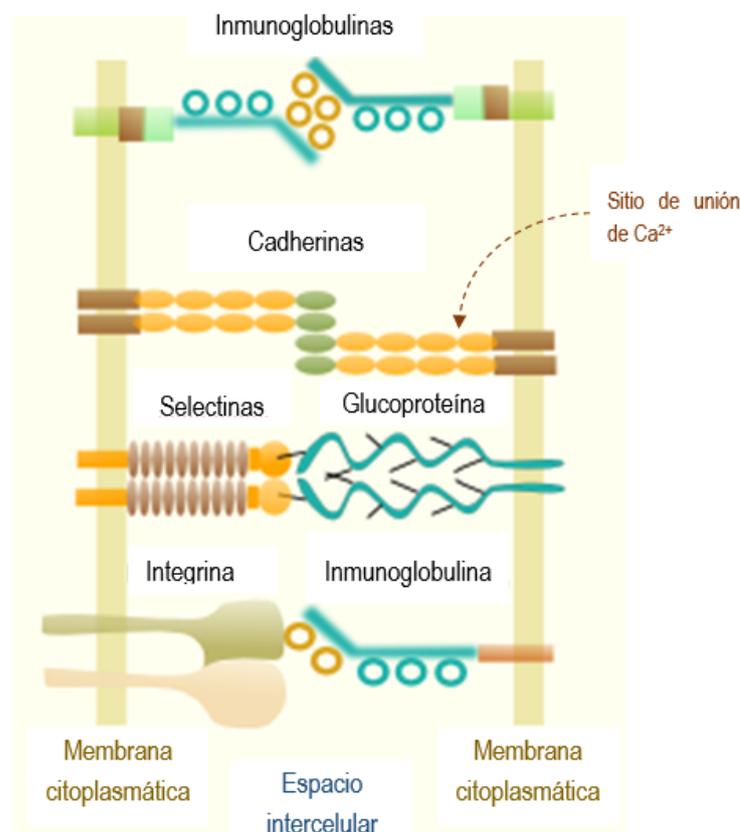


Figura I.17 Proteínas transmembrana de unión célula-célula
Adaptado de Molist P. et al. (2008) *Matriz extracelular. Glucoproteínas. Adhesión* [81]

Los dos tipos de adhesión (célula-célula y célula-matriz) desempeñan diferentes papeles críticos en los procesos de invasión del tejido y de metástasis. Las moléculas de adhesión intercelular ayudan a retener en su sitio las células. En las células cancerosas, sin embargo, estas moléculas o faltan o se hallan en una situación comprometida. La pérdida de la restricción adhesiva intercelular constituye una etapa importante e inicial del proceso de invasión.

Por ejemplo, varios tipos de cáncer pierden parcial o completamente la E-cadherina. Se ha demostrado experimentalmente la adquisición de capacidad invasiva en células no invasoras mediante el bloqueo de la función de la E-cadherina en cultivo. Así mismo, se ha demostrado el efecto antimetastásico de la E-cadherina al añadirla a células cancerosas que carecían de la misma e inyectarlas en ratones [82]. Sin embargo, no se ha podido demostrar un posible carácter antimetastático general, ya que algunos tipos de células tumorales mantienen la expresión de E-cadherina, incluso la sobreexpresan, y siguen siendo altamente metastáticas [83].

Por otro lado, para poder sobrevivir y proliferar las células necesitan estar adheridas a la matriz extracelular; esta unión viene mediatizada por las integrinas. Las células en cultivo tampoco proliferan si no se encuentran unidas a una superficie, de hecho en muchos casos no sólo suspenden la proliferación, sino que entran en apoptosis [84]–[86]. Este fenómeno se denomina dependencia de anclaje. Si se produce apoptosis el fenómeno se denomina anoikis. Se ha comprobado que las células desprendidas detienen su crecimiento porque se silencia el complejo ciclina E-Cdk2, que regula el crecimiento y división celular [87].

Sin embargo, las células cancerosas no poseen dependencia de anclaje. El complejo de ciclina E-Cdk2 de estas células permanece activo, se hallen o no ancladas. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual las células cancerígenas son capaces de burlar la dependencia de anclaje, se ha puesto de manifiesto con diversos experimentos que las proteínas sintetizadas por algunos oncogenes comunican al núcleo que la célula está bien anclada cuando en realidad no lo está, evitando que la célula detenga su crecimiento y muera por apoptosis.

I.1.2.3.b Degradación local de la matriz por enzimas proteolíticos

La dependencia de anclaje constituye sólo una de las barreras que la célula cancerosa debe superar para alcanzar los vasos. El siguiente paso es atravesar la membrana basal (delgada capa de matriz extracelular especializada) que impide el acceso desde las células epiteliales; las células normales no pueden atravesarla, a excepción de los leucocitos. Esto se debe a que utilizan mecanismos similares, como explicaremos posteriormente.

Para abrirse paso a través de la membrana basal, las células tumorales recurren a un proceso de disolución enzimática. Los enzimas proteolíticos son liberados al medio o se localizan tanto en la superficie de las células tumorales como en la de las células normales adyacentes. La disolución tendrá lugar cuando la cantidad de enzimas proteolíticos supere a la acción de los inhibidores proteásicos existentes de forma habitual en la matriz. En este caso se produce la destrucción de las glicoproteínas de unión, de modo que se reduzca la organización molecular y la resistencia del tejido [15].

En la destrucción de las matrices extracelulares intervienen varios enzimas proteolíticos o proteinasas, que pueden agruparse en cuatro clases diferentes: activadores del plasminógeno, colagenasas, catepsinas y proteoglicanasas.

Los activadores del plasminógeno son unas serino-proteasas que convierten el plasminógeno en plasmina. Existen dos tipos mayores de activadores del plasminógeno: el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el activador del plasminógeno uroquinasa (uPA). Este último ha sido identificado in vivo en células similares a los fibroblastos y es segregado por la mayoría de los carcinomas. La plasmina degrada la fibrina y lisa las glicoproteínas de unión; además, puede activar las colagenasas latentes.

Las colagenasas pertenecen al grupo de las metaloproteinasas de la matriz y su misión es altamente específica. Degradan las fibras de colágeno, resistentes al ataque de los otros tipos de proteasas debido a su estructura.

Las catepsinas son unas proteinasas que contribuyen a la destrucción de diversos componentes de la matriz, mediante la internalización y degradación lisosómica de fragmentos de macromoléculas generados por las hidrolasas fuera de la célula. Los niveles de éstas, sobre todo de catepsina B, se han correlacionado con el potencial metastásico in vivo de líneas celulares de melanoma, entre otros tumores.

Las proteoglicanasas ejercen su acción mediante la lisis de los proteoglicanos, componentes básicos de la sustancia fundamental de las matrices extracelulares. Esto favorece el movimiento de las células tumorales entre las fibras de colágeno, además de contribuir a la exposición de las redes de colágeno a la acción de las colagenasas. La degradación bioquímica de los proteoglicanos requiere dos tipos de enzimas: glucosidasas, que rompen las cadenas laterales de los glucosaminoglicanos, y proteinasas, que degradan el centro y proteínas de anclaje.

La célula cancerosa, una vez atravesada la primera membrana basal que la separaba del resto del organismo, penetra en una segunda membrana basal y la capa de células endoteliales que forman el forro interior de los vasos sanguíneos, de modo que accede al torrente circulatorio y puede ser transportada a otras partes del organismo. Para ello, las células tumorales requieren una elevada movilidad.

I.1.2.3.c Locomoción de las células tumorales a través de la matriz modificada

La locomoción celular se inicia con la pérdida de la adhesión intercelular mediante la disociación enzimática de las uniones intercelulares, facilitando la movilidad celular individual. De este modo, grupos de células pueden desprenderse del tumor primario.

Las células tumorales producen factores de motilidad autocrinos (AMFs) como la autotaxina, que inducen la protrusión de pseudópodos de manera que puedan interactuar con las proteínas de la matriz extracelular y realizar la migración de forma direccional. Dichos pseudópodos presentan un alto contenido en receptores para laminina, la fibronectina, el colágeno tipo IV y la trombospondina. Algunas de estas proteínas de la MEC estimulan la motilidad a través de receptores integrina.

La migración puede producirse en respuesta a los gradientes de concentración de factores solubles existentes en la MEC (quimiotaxis) o a las proteínas insolubles de la matriz extracelular

(haptotaxis). En las etapas iniciales del proceso metastásico tiene mayor relevancia la migración haptotáctica, mientras que más tarde las células responden de forma preferente a estímulos quimiotácticos [15], [18], [88].

Existe un tercer grupo de factores de motilidad como el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), la IL-8 y la histamina. Son factores de motilidad paracrina y dirigen a las células tumorales al órgano que las ha producido.

En resumen, aunque se desconocen los mecanismos moleculares con exactitud, los factores de motilidad pueden provocar cambios en la forma de las células, una reorganización del citoesqueleto de actina donde intervienen integrinas, moléculas de matriz extracelular y componentes intracelulares y cambios en la adhesión celular y en la fluidez de la membrana. El resultado es un movimiento celular ameboide con extensión de pseudópodos equiparable al que realizan los leucocitos.

I.1.2.4 Diseminación de las células tumorales

Sólo un pequeño porcentaje de las células tumorales que penetran en el torrente circulatorio consiguen sobrevivir, extravasarse y generar metástasis en un tejido distante al origen primario (en torno a un 0.01%) [89]–[91]. Un porcentaje elevado de estas células es rápidamente destruido por la circulación, bien por el sistema inmunológico del huésped, bien por fuerzas hemodinámicas. Este proceso se conoce como “ineficiencia metastásica”.

La diseminación de las células tumorales suele llevarse a cabo a través de dos vías principales: la linfática y la hemática. Ambas vías están interconectadas en numerosos puntos, por lo que las células tumorales pueden pasar fácilmente de un sistema a otro [92]. La diseminación hemática es la más importante en la mayoría de los tumores malignos. Una vez que las células tumorales han penetrado en los vasos sanguíneos, pueden ser transportadas por un mecanismo pasivo o bien desarrollarse en el sitio de penetración y a partir de ahí enviar émbolos tumorales a la circulación [93].

Para poder sobrevivir en el torrente circulatorio, las células sanguíneas tienen que ser deformables, de modo que no queden atrapadas en los capilares estrechos. Parece ser que las células tumorales son menos deformables; si no son capaces de adoptar forma cilíndrica para continuar su paso a través del capilar, se produce su muerte por rotura de la membrana celular debido al trauma mecánico. Esto supone otra limitación en el proceso metastásico; no obstante, algunas células tumorales poseen una deformabilidad aumentada, pudiendo sobrevivir en la microcirculación [93], [94]. También la deformabilidad relativa de las paredes de los vasos es un factor condicionante en la supervivencia de las células tumorales. Si la célula se detiene, el aumento de la presión sanguínea conllevaría un aumento en la tensión de la membrana celular, pudiendo causar su rotura. Una vez que la célula tumoral ha transformado su morfología en cilíndrica, el plasma le facilita el paso, ya que actúa como lubricante entre la superficie celular y la pared del vaso.

Otro de los mecanismos que permite la supervivencia de las células tumorales es la formación de émbolos, bien con otras células tumorales, bien agregándose a las plaquetas o a los linfocitos del huésped.

Las células tumorales se sitúan en la zona central del émbolo quedando protegidas por la capa celular externa de las hostilidades del lecho vascular. Además, se ha observado que las agrupaciones de células tumorales son capaces de producir un número significativamente mayor de focos metastásicos que el mismo número de células circulantes aisladas. El tamaño del émbolo tumoral guarda también una relación directa con el número de metástasis, quedando limitados por el tamaño del vaso en el que introducen [95], [96].

En cuanto a la vía linfática, las células tumorales pueden penetrar fácilmente en los vasos linfáticos y ser transportadas por la linfa. Los émbolos tumorales pueden quedar atrapados en el primer nodo linfático que se encuentren o pueden desviarse y continuar hasta detenerse en nodos lejanos (“metástasis salteadas” o “skip metastasis” en inglés) [92].

Además del trauma mecánico, el sistema inmunológico del huésped es el otro gran responsable de la muerte de células tumorales en la microcirculación. La vigilancia inmune inespecífica se efectúa por macrófagos, células natural-killer (NK) y neutrófilos, mientras que la específica es llevada a cabo por antígenos dependientes de los linfocitos T (CD4+, CD8+) y anticuerpos. No obstante, las células tumorales no sólo son capaces de burlar al sistema inmunológico, sino que además son capaces de modificar algunos tipos de células inflamatorias, consiguiendo que fomenten el desarrollo del tumor en lugar de atacarlo [97].

I.1.2.5 Detención de las células a nivel de los capilares del órgano diana

Al menos dos procesos contribuyen a la parada de las células tumorales en los capilares del órgano diana: uno consistente en un atrapamiento mecánico inespecífico y otro que se produce mediante las interacciones específicas entre los componentes del émbolo tumoral y la pared vascular.

Existen zonas donde se reduce el calibre de los vasos a la vez que la velocidad del flujo sanguíneo. Esto permite que se produzcan fenómenos de microcoagulación que facilitan la adhesión endotelial de las células tumorales en circulación. Este fenómeno se conoce como “atrapamiento mecánico inespecífico” y tiene lugar sobre todo en tejidos u órganos con doble vascularización, como hígado y pulmón y en los lugares donde existen derivaciones arteriovenosas, como huesos y suprarrenales. También pueden detenerse en zonas en la que existe daño endotelial, penetrando a través de la membrana basal.

La inflamación local de los tejidos es otro de los factores favorecedores de la parada de células tumorales. La relación entre cáncer e inflamación es compleja. Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas o quimioatrayentes de bajo peso molecular que permiten la migración celular, atrayendo a células que expresan sus receptores [92]. Actualmente se considera que cualquier tipo de célula puede expresarlas.

La expresión de estos receptores en una célula depende de su estirpe, de la fase de diferenciación, de la concentración de quimiocinas producidas en su microambiente, de las citocinas inflamatorias (como la IL-1 o el factor de necrosis tumoral, TNF) y de la existencia de hipoxia local. La unión de estas quimiocinas a sus receptores en la superficie celular conlleva una serie compleja de

respuestas celulares, como la activación de varias vías de señalización celular y reorganización del citoesqueleto. Los receptores de quimiocinas actúan a través de proteínas G heterotriméricas que regulan vías de transducción que incluyen, entre otras, MAP cinasas, RAS y GTPasas de la familia Rho. Existen además mecanismos de colaboración entre quimiocinas y metaloproteinasas [98].

Las quimiocinas actúan como mediadoras en el reclutamiento de diferentes tipos celulares en el microambiente tumoral, como linfocitos, macrófagos y neutrófilos asociados a tumores (TAM y TAN), fibroblastos, células madre mesenquimales y células endoteliales. Aunque existen cada vez más evidencias de que las quimiocinas presentes en los tumores humanos contribuyen más en general al crecimiento tumoral, progresión e inmunosupresión que a producir una respuesta antitumoral efectiva, lo cierto es que las interacciones quimiocina-receptor en unos casos potencian y en otros dificultan la respuesta inmune.

Dado que algunas quimiocinas son abundantes en órganos que son asiento común de metástasis, y sus receptores son expresados por las células tumorales, se planteó la hipótesis de que un gradiente de estas quimiocinas facilitaría selectivamente las metástasis a esos órganos. El hallazgo posterior de la producción de estas quimiocinas por las propias células tumorales, y su efecto autocrino, obliga a replantear esta hipótesis.

En el melanoma las células tumorales adquieren ventajas de la expresión de quimiocinas y receptores alterando su microambiente, estimulando la angiogénesis y evadiendo la respuesta inmune, facilitando así la progresión tumoral.

I.1.2.6 Invasión secundaria

La invasión secundaria comprende desde la extravasación de las células tumorales hasta la implantación de un núcleo metastásico. La extravasación de las células tumorales, mediante la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular del tejido receptor, está considerado otro de los pasos limitantes en el proceso de metástasis [93].

Tras detenerse en la microcirculación, las células tumorales pueden crecer con el vaso sanguíneo o pueden atravesar la pared del vaso e infiltrarse en el parénquima circundante. Numerosas evidencias sugieren que las plaquetas juegan un papel importante en este proceso. Estudios con agentes antiplaquetarios han demostrado una reducción en la formación de metástasis. Las plaquetas se agregan a la unión entre las células tumorales y las células epiteliales poco después de la detención de las células. Varios estudios demuestran que la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ juega un papel importante en este proceso. La $\alpha_{IIb}\beta_3$ es secuestrada por las plaquetas y redistribuida en la superficie celular en respuesta a la trombina. Una vez presente en la superficie plaquetaria, el receptor de $\alpha_{IIb}\beta_3$ inicia la adhesión y agregación plaquetaria mediante la interacción con diversos componentes de la matriz extracelular, incluyendo fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina y factor de von Willebrand. Las plaquetas agregadas liberan diversos mediadores, algunos de los cuales aumentan la expresión de los receptores de integrinas en las células tumorales [92].

Posteriormente se produce la retracción endotelial, otro paso clave en el proceso metastásico. Esto permite a las células tumorales entrar en contacto con la membrana basal. En este punto, comienza la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular. Una vez las células tumorales se encuentran en una posición extravascular, comienza su proliferación. Cuando la nueva micrometástasis alcanza un tamaño de aproximadamente 1mm, como comentamos anteriormente, necesitará además de la presencia de factores de crecimiento tanto paracrinos (locales) como autocrinos (segregados por las propias células tumorales), una nueva red vascular que asegure el aporte de nutrientes. Si no se produce la angiogénesis, la micrometástasis será destruida o permanecerá quiescente, en un estado de latencia que se conoce como "Tumor dormido" [99].

I.1.2.7 Tumor dormido

Las metástasis pueden aparecer mucho tiempo después de que el tumor primario se haya eliminado con éxito. Por ejemplo, en cáncer de mama, próstata o melanoma, pueden aparecer metástasis décadas después del tratamiento inicial [9]. De hecho, en la mayoría de los cánceres persiste una pequeña cantidad de células tumorales diseminadas después del tratamiento. Esta se encuentra por debajo del nivel de detección de las técnicas convencionales y se conoce como enfermedad mínima residual [100], [101]. Las células tumorales diseminadas que persisten después del tratamiento oncológico constituyen la fuente de recidiva de la enfermedad. Habitualmente permanecen latentes en los ganglios linfáticos, la sangre periférica o la médula ósea, y en menor medida en pulmones o hígado.

Dónde se encuentran las células tumorales durante este periodo de latencia y qué las despierta son dos de los interrogantes clínicamente relevantes en la actualidad. Los estudios realizados con modelos matemáticos indican que probablemente se produzcan periodos de crecimiento discontinuos y periodos de quiescencia [9].

El período de latencia puede explicarse en parte debido a la acumulación progresiva de alteraciones genéticas que pueden conducir a la inmortalización celular (pérdida de p53 o Rb1, ganancia de telomerasa, etc) y su transformación (mutaciones activadoras de Ras y Braf, amplificación de Erbb2, etc).

La latencia del cáncer puede tener lugar por tres mecanismos [100], [102]:

1. Latencia celular: Las células tumorales entran en un estado de detención del ciclo celular en la transición G₀-G₁. Estas células desarrollan mecanismos para evadir el reconocimiento del sistema inmunológico.
2. Latencia angiogénica: Se produce como resultado del balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos, como el VEGF y la trombospondina (TSP) respectivamente. Las alteraciones genéticas en las rutas que mantienen el equilibrio, pueden activar la angiogénesis y, por tanto, la proliferación tumoral. Como ya hemos comentado anteriormente, el oncogén Ras puede inducir VEGF y reprimir TSP, mientras

que p53 o p38 pueden inducir TSP e inhibir VEGF. La pérdida de función de p53 y/o p38 podría inclinar la balanza en favor de la angiogénesis.

3. Inmunovigilancia: El sistema inmunológico mantiene el número de células tumorales en niveles muy bajos. Se ha descrito el papel citotóxico de los linfocitos T CD8+ y de anticuerpos antiidiotipo sobre el receptor de células B. La interrupción del estado de latencia podría deberse a una regulación negativa de antígenos específicos de tumores o por la expresión de moléculas coestimuladoras que inducen apoptosis en los linfocitos T CD8+.

Se desconoce si estas formas de latencia son mutuamente excluyentes (aunque es probable que no lo sean), cuánto duran o si ocurren en distintos momentos. Actualmente se postula que la latencia celular precede a las otras dos.

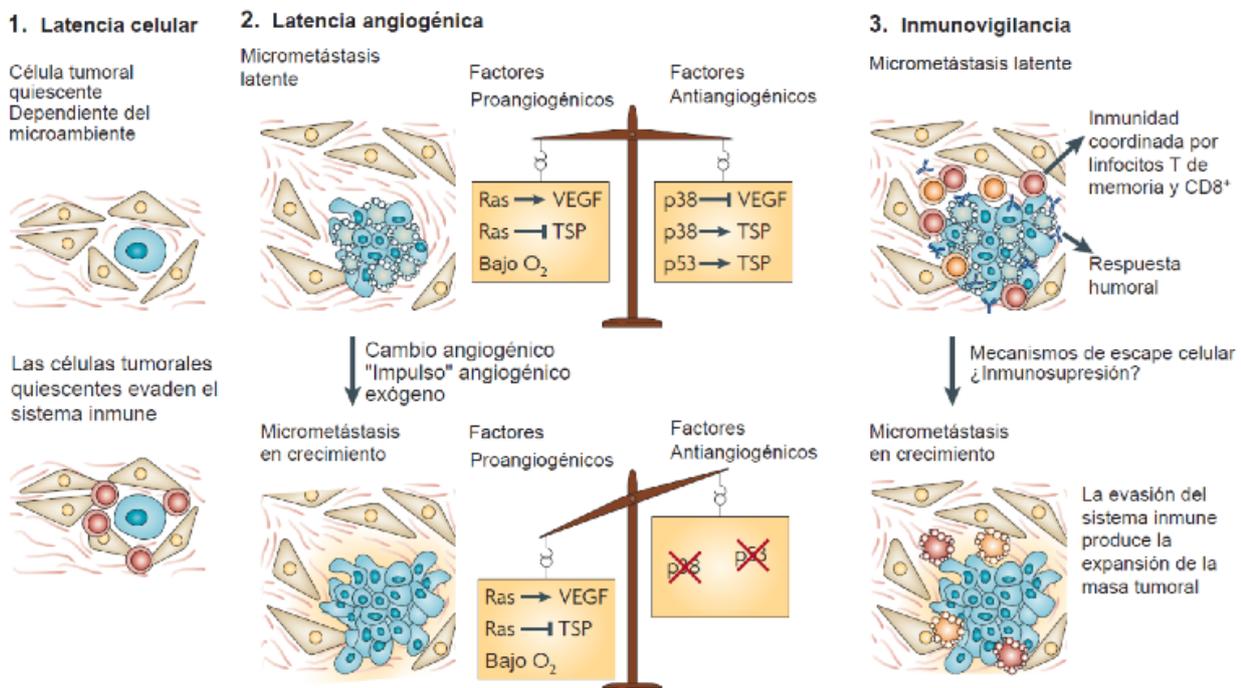


Figura 1.18 Mecanismos de latencia del cáncer

Adaptado de Aguirre-Ghiso, J. A. (2007)

Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy [100]

El control inmunológico del tumor dormido supone un delicado balance que depende de las propiedades del huésped (microambiente local, estatus del sistema inmune) y de las inherentes al tumor (inmunogenicidad, capacidad metastásica), pudiendo revertir de dicho estado no sólo mediante inmunosupresión sino también mediante inmunoestimulación, lo que tiene importantes connotaciones terapéuticas [99].

El secuestro de las células tumorales en una cápsula formada por los tejidos del huésped puede inhibir la proliferación tumoral, de manera que el compartimento intersticial sea un medio adecuado para la viabilidad pero no para el crecimiento de la población celular. Sin embargo, al modificarse las

condiciones del microambiente debido a intervenciones quirúrgicas, traumatismos o tratamientos radioterápicos se ha observado una aceleración en el crecimiento de las metástasis [90], [99].

Es posible que células tumorales en circulación (CTCs) puedan reinfiltrarse en los mismos tumores de los que partieron. De acuerdo con esta hipótesis, denominada “autosiembra” o “self-seeding” en inglés [103], [104], los tumores pueden autoenriquecerse con su progenie más agresiva, ofreciendo un mecanismo que asocia la habilidad metastásica con el crecimiento del tumor. Una vez eliminado el tumor primario, ya no puede atraer a las células tumorales, por lo que estas se diseminan [90].

Para progresar, las metástasis necesitan que las células tumorales tengan la habilidad de reiniciar el crecimiento tumoral una vez han accedido a un tejido distinto. No todas las células en un tumor son capaces de dividirse infinitamente, por lo que tampoco todas las que han accedido al lugar de metástasis son capaces de reiniciar el tumor. Sólo un subgrupo de células tumorales tiene la capacidad de actuar como células propagadoras del tumor. Esta capacidad las define como células madre tumorales o células de propagación tumoral, que ayudarán al mantenimiento de los tumores primarios y serán esenciales para el establecimiento de colonias metastásicas [104].

El equipo de Massagué ha postulado la “teoría de la especiación metastásica de poblaciones tumorales”. Dado que existe un alto grado de diversidad biológica en las metástasis según los órganos, existen a su vez susceptibilidades distintas por parte de los tumores, y procesos de adaptación distintos según los órganos implicados. Esto les lleva a postular que las células tumorales en la circulación serán capaces de infiltrar un órgano determinado solamente si poseen las funciones necesarias para atravesar las paredes de los capilares de este órgano. De las células individuales que pasan esta selección, solamente serán viables aquellas que, además, estén equipadas con funciones para sobrevivir en el nuevo entorno. Finalmente, estas células tumorales recién llegadas al nuevo entorno darán lugar a metástasis solamente en la medida en que sean capaces de evolucionar adaptándose, cada vez más provechosamente, al nuevo entorno. El resultado final de estos procesos sería la aparición de distintas especies de células metastásicas según el órgano en que se desarrollaron [104].

I.2 Regulación de la proliferación celular

I.2.1 Bases moleculares del ciclo celular.

Como postuló Rudolph Virchow en 1855, cada célula proviene de otra célula (“*omnis cellula e cellula*”) [105]. Virchow corrigió y amplió la teoría celular de Schwann y Schleiden, estableciendo que las células son la unidad fundamental de la vida y que las células se forman sólo a partir de otras células. También defendió la idea de que la enfermedad era el resultado de alteraciones en las células y realizó grandes contribuciones al campo de la patología celular.

Las células existentes se dividen a través de una secuencia ordenada de acontecimientos en los que duplican su contenido y se dividen en dos. Este ciclo de duplicación y división se conoce como ciclo celular [21]. Consta de dos grandes fases:

1. Interfase, que ocupa casi el 95% del ciclo y se divide en 3 subetapas:
 - a. Fase G₁ (intervalo o "Gap" 1): Etapa entre la fase M y la S, en la cual la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite duplicar su tamaño (duplicando el número de proteínas y orgánulos), de lo contrario las células se harían más pequeñas con cada división.
 - b. Fase de síntesis (S): En esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus hijas. Esta fase dura 10-12 horas en mamíferos (la mitad del tiempo que dura el ciclo celular completo).
 - c. Fase G₂ (intervalo o "Gap" 2): Etapa entre la fase S y M en las cual la célula se prepara para dividirse.
2. Fase M (mitosis): Se produce la segregación de los cromosomas de modo que se reparte a cada célula hija una copia del material genético. Esta fase dura una hora en mamíferos.

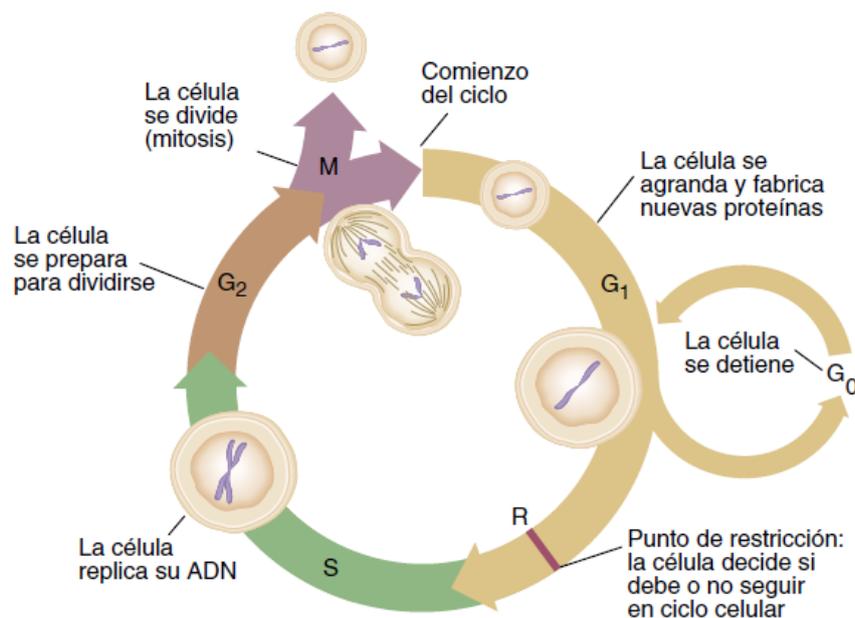


Figura 1.19 Etapas del ciclo celular
Weinberg R. A. (1996) *Así se produce el cáncer* [26]

Una vez finalizada la mitosis, las células hijas entran en fase G₁ y continúan el ciclo de reproducción. Cuando ya no se requieren más células, éstas entran en un estado denominado G₀, en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de quiescencia. En este periodo, el metabolismo fundamental de la célula es bajo, incluidas muchas de las funciones habitualmente activas, como la transcripción y la síntesis de proteínas. Algunas células al entrar en estado G₀ abandonan indefinidamente el ciclo celular, como es el caso de las neuronas. Pueden abandonarlo para llevar procesos de

diferenciación o de muerte celular programada (apoptosis). Si las condiciones extracelulares son favorables y las señales del medio indican que hay que crecer y dividirse, las células en G₁ temprana o G₀ progresan a través de un punto de determinación próximo al final de G₁ denominado punto de restricción en mamíferos. Superado este punto, las células quedan determinadas para replicar el ADN, incluso aunque desaparezcan las señales extracelulares que estimulan el crecimiento y la división celular.

La progresión del ciclo celular en los organismos eucariotas está regulada por la formación secuencial y la activación e inactivación de un conjunto de moléculas. Estas moléculas implican a dos grandes familias de proteínas, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Además de estos “reguladores positivos” existe una familia de proteínas inhibitoras de las CDK (CDKIs) (“reguladores negativos”) que bloquean la actividad de uno o varios complejos CDK/ciclina, así como las CDKs propiamente dichas.

En cada fase del ciclo se produce la aparición y activación de complejos CDK/ciclina, que actúan sobre sustratos específicos, activándolos o inhibiéndolos y haciendo así que el ciclo progrese a través de sus diferentes etapas [106].

Las ciclinas, que sufren un ciclo de síntesis (durante la interfase) y degradación (al final de la mitosis) en cada ciclo de división celular, actúan como reguladoras de la actividad enzimática de las CDKs y su concentración varía a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular

Las CDKs permanecen inactivas. Al formarse el complejo con la ciclina, la CDK queda activada. Las CDKs son las encargadas de fosforilar aminoácidos específicos de algunas proteínas durante la progresión del ciclo celular.

Las CDKIs están implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas, como pueden ser la privación de factores de crecimiento, citoquinas, daño en el ADN, etc. En células animales se dividen en dos familias: la CIP/KIP y la INK4, que difieren en estructura, mecanismo de acción y especificidad.

La entrada de la célula en el ciclo celular se produce cuando ésta recibe señales mitóticas que la hacen pasar de G₀ a G₁. En ese momento se activa la expresión de ciclina D que se une a las CDK4 y CDK6 y de ciclina E que se une a CDK2, activándolas y produciendo la hiperfosforilación de la proteína pRb. Ésta a su vez, libera al factor de transcripción E2F y provoca la transición de la fase G₁ a la S. En este punto se encuentra lo que se conoce como punto de restricción (R).

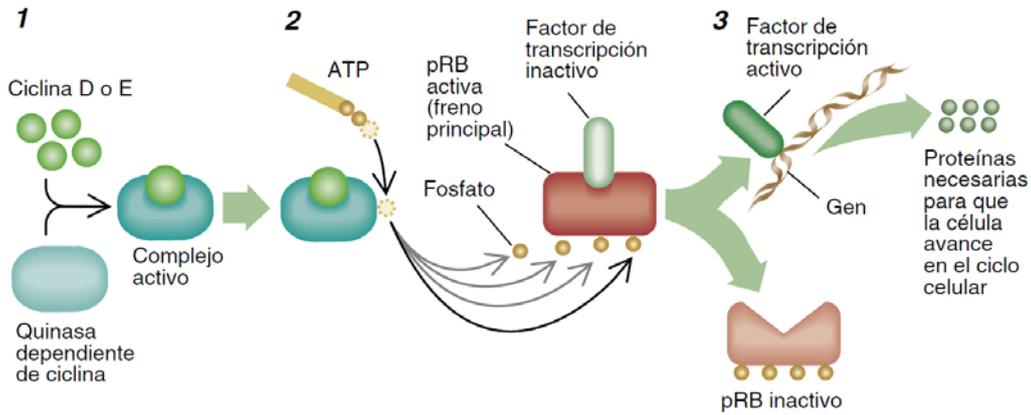


Figura I.20 Conmutador molecular del ciclo celular
Weinberg R. A. (1996) *Así se produce el cáncer* [26]

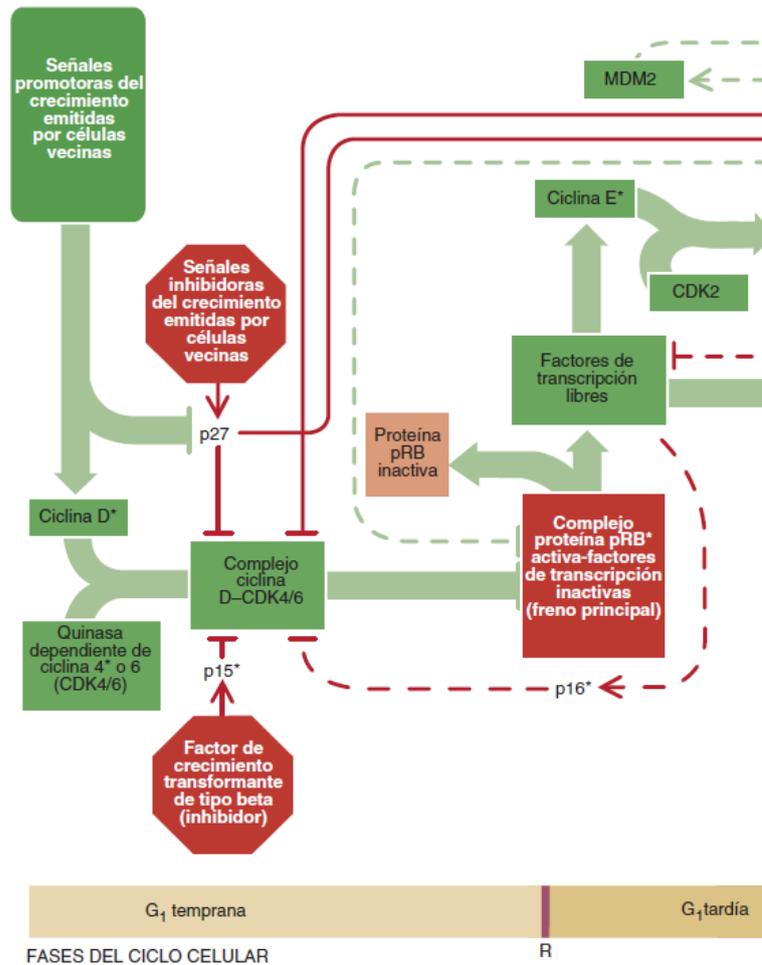


Figura I.21 Primer fragmento del ciclo celular
Weinberg R. A. (1996) *Así se produce el cáncer* [26]

Tanto la expresión de las ciclinas como la formación y función de los complejos CDK/ciclina se hallan regulados por dos grandes familias de proteínas que son capaces de inhibir ya sea a las CDKs propiamente dichas (familia INK4) o a los complejos CDK/ciclina (familia CIP/KIP).

- La familia CIP/KIP incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí: p21, p27 y p57, y presenta una especificidad más amplia que la familia INK4
 - La p21 bloquea el ciclo celular en la transición G1/S, uniéndose a los complejos CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E, responsables de dicha transición. Esta parada del ciclo celular permite a la célula reparar el ADN dañado antes de replicarse. Cuando se daña el ADN, se provoca un incremento de la concentración y de la actividad de la proteína p53. Cuando se activa p53 se estimula la traducción de p21.
 - La p27 regula señales inhibitoras del crecimiento y la inhibición por contacto.
 - La p57 tiene una ruta de expresión tejido-específica, lo que sugiere un papel especializado en el control del ciclo celular
- La familia INK4 incluye cinco proteínas: p14, p15, p16, p18 y p19. Se unen sólo a CDK en el sitio de unión de las ciclinas e inhiben específicamente CDK4 y CDK6, implicadas en el control de la fase G1.

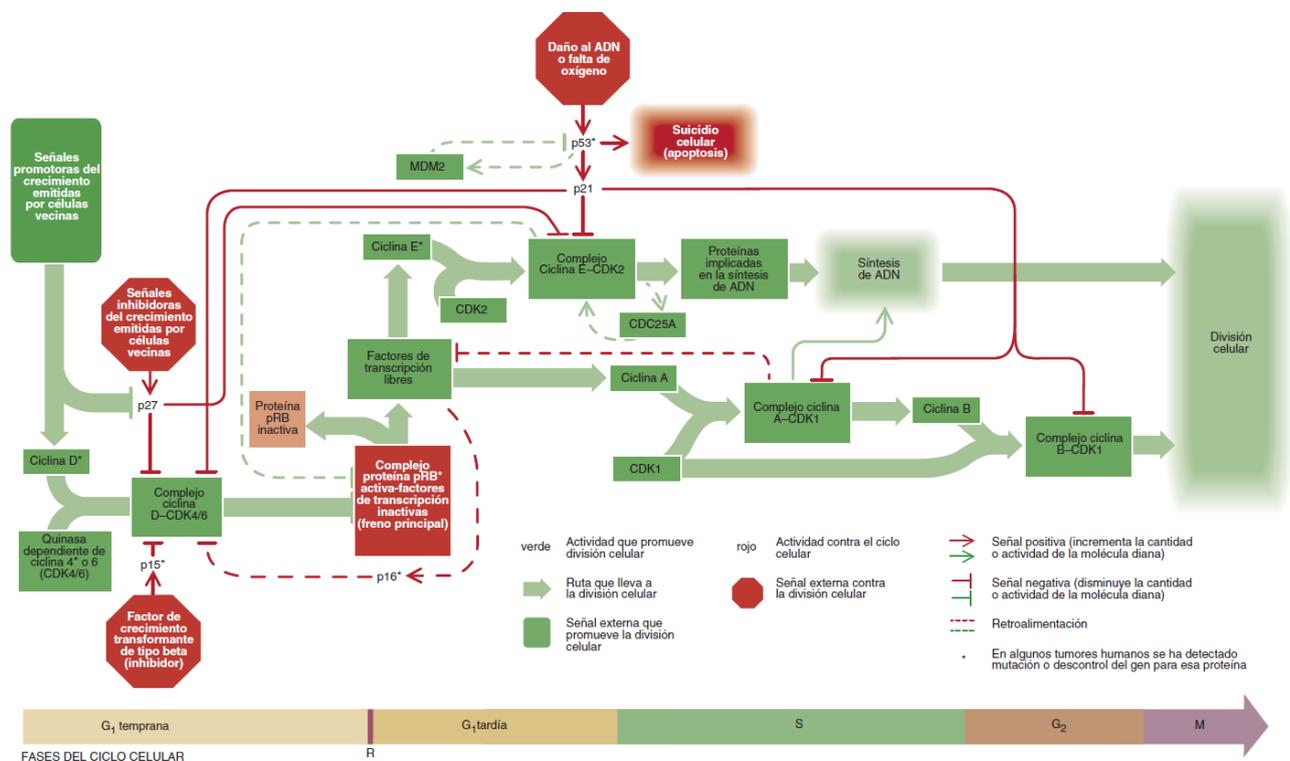


Figura 1.23 Ciclo celular
Weinberg R. A. (1996) *Así se produce el cáncer* [26]

Además de estos inhibidores, en el ciclo celular existen tres puntos de control o checkpoints que se activan cuando se detecta daño en el ADN (ATM/ATR) que a su vez activan las quinasas efectoras (CHK1 y CHK2) y detienen el ciclo celular hasta que el daño es reparado. Para ello, activan a su vez a p53, que es la encargada de poner en marcha las rutas de reparación y, si ésta no es posible, la apoptosis.

- Punto de control de ADN no replicado, localizado en la entrada de fase M. La proteína quinasa ATM (ataxia telangiectasia mutado) reconoce las rupturas en la doble cadena y su proteína relacionada ATR reconoce el ADN no replicado. Éstas fosforilan a CHK1 y CHK2. CHK1 actúa inhibiendo a Cdc25, que es un activador de la CDK1/Ciclina A-B, mientras que CHK2 activa a p53 [107].
- Punto de control M: punto de control de la separación de cromosomas al final de la mitosis, localizado en la metafase, que comprueba el alineamiento correcto de los cromosomas en el huso mitótico antes de permitir que tenga lugar la mitosis propiamente dicha. En el caso de que este alineamiento fuera incorrecto, se impediría la degradación de la ciclina B por ubiquitinación.
- Puntos de control del daño del ADN, localizados en la transición G₁/S, en la fase S y en la transición G₂/M. El daño celular activa a p53, proteína implicada en la reparación del ADN, que detiene el ciclo promoviendo la transcripción de p21, y, en caso de que todo falle, induce la apoptosis.
 - Transición G₁/S: Controla que la célula haya alcanzado el tamaño necesario y la integridad del ADN.
 - Transición G₂/M: Controla que se haya completado la replicación del ADN y que no haya daños.

Una de las características principales del cáncer es la pérdida de control sobre la proliferación celular. Como ya hemos comentado ésta viene regulada por diversos genes que la promueven o inhiben; cuando éstos sufren alguna mutación, contribuyen a la formación de células cancerígenas. Por ejemplo, si no se llevan a cabo los puntos de control necesarios, en cuyo caso la célula continúa dividiéndose sin reparar el ADN dañado. También puede producirse una desregulación de las proteínas u otras moléculas implicadas en la regulación del ciclo.

Las CDKs son una familia de serina/treonina quinasas que desempeñan labores fundamentales tanto en el desarrollo del ciclo celular (condensación cromosómica, reorganización del citoesqueleto o ruptura de la membrana nuclear) como en la regulación de la transcripción. Se encuentran sobreexpresadas en un 25-30% de los cánceres humanos, colocándose en la lista de potenciales dianas antitumorales. Diversos fármacos inhibidores de las CDKs se encuentran ya en diferentes etapas de ensayo clínico [106].

El estrés celular puede inducir cambios tumorigénicos en las células. Éstas intentan evitar la transformación mediante la detención del ciclo celular o mediante muerte celular. La detención del ciclo celular permite la reparación del ADN dañado; si se repara con éxito, el ciclo celular se reanuda y la célula

se divide. Si no se repara adecuadamente, la célula se vuelve senescente y no se divide. Si no se vuelve senescente, hay que inducir la muerte celular para prevenir la tumorigénesis. Existen diversas rutas, algunas de las cuales utilizan los mismos mediadores de señalización, incluyendo las que conducen a la apoptosis, autofagia y necrosis [108].

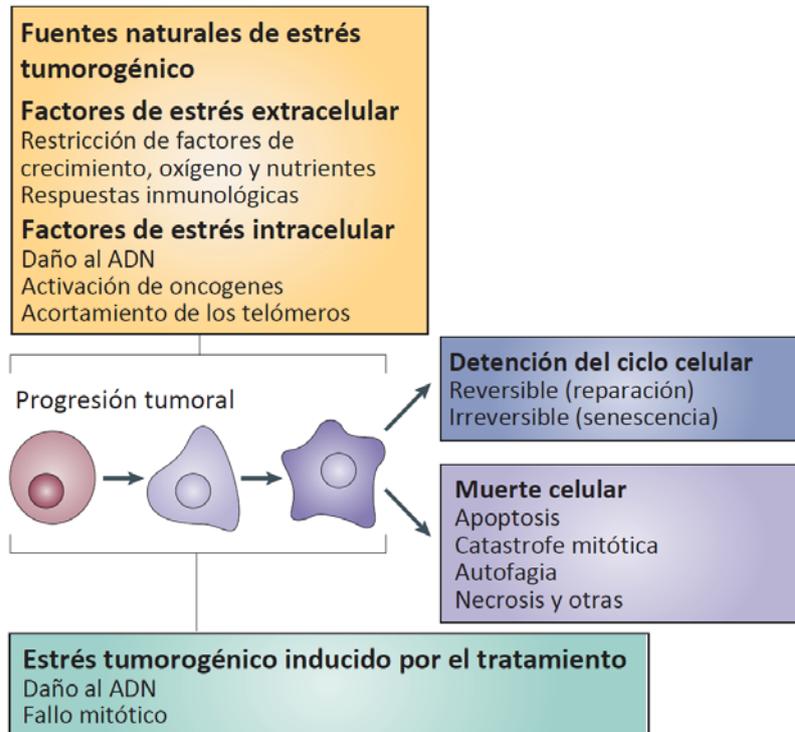


Figura 1.24 Respuestas de las células a distintos tipos de estrés [108]

1.2.2 Senescencia celular

La senescencia celular fue descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead en 1961 [109]. Las células primarias en cultivo se someten inicialmente a un período de rápida proliferación, durante el cual los telómeros de sus cromosomas se acortan significativamente. Con el tiempo, el crecimiento celular se desacelera y las células pierden su capacidad mitótica tras aproximadamente 50 divisiones *in vitro* (denominado "límite de Hayflick") entrando en una forma de la detención del ciclo celular permanente que se conoce como "senescencia replicativa". Hipotetizó que ese estancamiento en la proliferación celular constituiría la base del envejecimiento. Asimismo, postuló que las células están programadas para perder la capacidad de multiplicarse después de cierto número de divisiones y que ese límite interno impediría que las células alteradas proliferasen de forma incontrolada y se volvieran cancerosas. Sin embargo, estudios posteriores desmontaron esta teoría y se formuló la hipótesis de que se produce una diferenciación celular *in vitro* [108], [110], [111].

Una célula senescente habitualmente muestra cambios morfológicos como un citoplasma aplanado y un aumento de la granularidad. A nivel bioquímico, la senescencia se acompaña de cambios en el metabolismo y la inducción de actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia. A nivel genético, se producen alteraciones en la estructura de la cromatina y en la expresión génica. La mayoría de las células senescentes expresan p16INK4a, gen supresor de tumores y su expresión se incrementa con la edad [108], [112]. Este aumento está asociado con una menor capacidad de las células para proliferar y reparar los tejidos dañados. El equipo de Sharpless demostró que el envejecimiento iba acompañado de un aumento acentuado de la concentración de p16 en los linfocitos T del sistema inmunitario humano y publicó una serie de resultados experimentales que refuerzan la idea de que la senescencia celular contribuye al deterioro de los órganos y los tejidos [113]–[115].

La senescencia también puede ser inducida por varios tipos de estrés celular, y aunque las células en esta situación no muestran acortamiento de los telómeros, sí muestran los otros fenotipos característicos de la senescencia. Fuentes de estrés como el daño al ADN y la recepción de señales mitóticas fuertes producidas por oncogenes, así como los agentes que inducen acortamiento de los telómeros, también pueden desencadenar el proceso de senescencia. En este caso, se produce la activación de diversos inhibidores del ciclo celular y la participación de p53 y pRb. Se hipotetizaba que la implicación de estos genes supresores de tumores indicaba que una de las principales funciones del programa de senescencia era impedir la malignización de las células; hipótesis que ha sido confirmado en modelos animales.

Sin embargo, a finales de los noventa se obtuvieron indicios de que las células senescentes podían modificar su microambiente y en 2001 el equipo de Campisi demostró que fibroblastos humanos senescentes podían promover el cáncer [116]. Estudios posteriores en esta misma línea, le han llevado a postular que la senescencia está relacionada con el mecanismo de cicatrización y que las células tumorales se aprovechan de este mecanismo para promover su crecimiento. Las células senescentes segregan enzimas degradantes para terminar con las proteínas fibrosas destinadas al andamio de reparación (fenotipo secretor asociado a la senescencia o SASP); tal destrucción limita la formación de la cicatriz [110], [112].

I.2.3 Muerte celular

La muerte celular juega un papel fundamental en la regulación y mantenimiento de la homeostasis tisular, de modo que se produzca un equilibrio con la proliferación celular. Podemos distinguir dos tipos de muerte celular: la regulada (apoptosis y autofagia) y la no regulada (necrosis).

I.2.3.1 Muerte regulada de tipo I: Apoptosis

Las células que mueren por apoptosis experimentan cambios morfológicos característicos. Se encogen y se condensan, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta. La superficie celular a menudo emite protrusiones y, si la célula es

grande, con frecuencia se rompe en fragmentos de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Además, la superficie de la célula o de los cuerpos apoptóticos se altera químicamente, de modo que una célula adyacente o macrófago los fagocita con rapidez antes de que puedan liberar su contenido. De esta manera, la célula muere limpiamente y es eliminada en muy poco tiempo, sin provocar una respuesta inflamatoria perjudicial.

La apoptosis puede iniciarse de dos formas: a través de receptores de muerte situados en la superficie celular (ruta extrínseca) o a través de la mitocondria (ruta intrínseca). En ambas rutas, la inducción de la apoptosis lleva a la activación de una caspasa iniciadora. La caspasa-8 (y posiblemente también la caspasa-10) en la vía extrínseca, y la caspasa-9, que se activa en el apoptosoma, en la vía intrínseca. Las caspasas iniciadoras escinden y activan caspasas ejecutoras, que a su vez escinden y activan otras procaspasas ejecutoras así como proteínas diana específicas de la célula, que a la larga resulta en apoptosis. Las dos vías están comunicadas. Por ejemplo, la escisión del miembro Bid de la familia Bcl2 por la caspasa-8 activa la vía mitocondrial después de la inducción de la apoptosis a través de receptores de muerte, y se puede utilizar para amplificar la señal apoptótica [117]

1.2.3.1.a Vía extrínseca o de los “receptores de muerte”

La unión de proteínas de señalización extracelulares a receptores de muerte de la superficie celular activa la vía extrínseca de la apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión al ligando, un único dominio transmembrana (TM) y un dominio de muerte (DD) intracelular, necesario para que los receptores activen el programa apoptótico. Los receptores son homotrimeros y pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que incluye el receptor del propio TNF y el receptor de muerte Fas. Los ligandos que activan los receptores de muerte también son homotrimeros; son estructuralmente homólogos entre sí y pertenecen a la familia del TNF de proteínas de señalización [21]. Algunos ejemplos son CD95, TRAIL-R1 (ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF-R1) y TRAIL-R2 [117].

Cuando el ligando de muerte se une a su receptor, los dominios de muerte de las colas citosólicas de los receptores de muerte reclutan proteínas adaptadoras intracelulares, las cuales a su vez reclutan a las procaspasas iniciadoras, formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). En la ruta de Fas, la caspasa-8 (también llamada Flice) es reclutada por la proteína FADD (dominio de muerte asociado a Fas).

La apoptosis mediada por receptores de muerte puede ser inhibida a distintos niveles por proteínas antiapoptóticas. Algunas células producen receptores solubles “señuelo”, que tienen un dominio de unión al ligando pero no un dominio de muerte, compitiendo con los receptores de muerte e inhibiendo de este modo la apoptosis; por ejemplo sCD95 o DcR3 pueden impedir que el ligando de muerte, en este caso el de Fas (CD95L), se una a su receptor (CD95). Por otra parte, las proteínas inhibidoras de Flice (FLIPs) pueden unirse al DISC para prevenir la activación de la caspasa-8. Estas proteínas tienen el aspecto de una caspasa pero carecen de dominio proteolítico. Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) pueden, a su vez, unirse a las caspasas ejecutoras e inhibirlas.

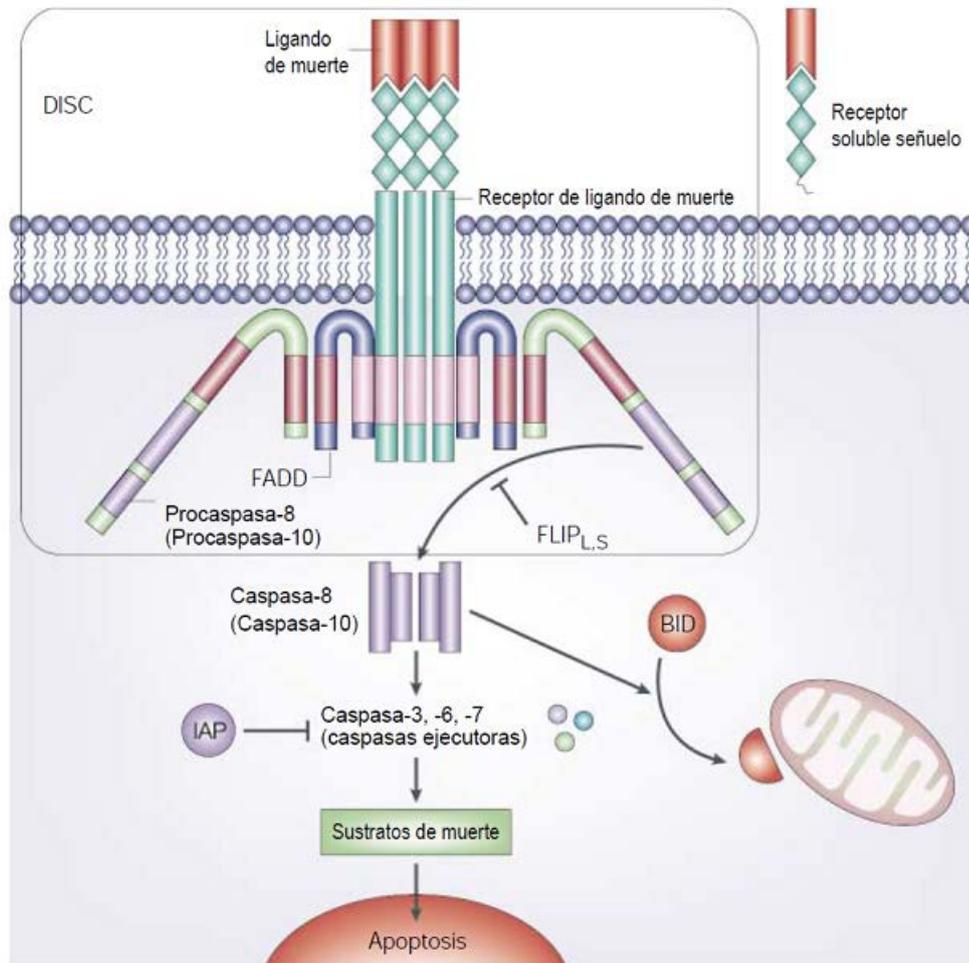


Figura I.25 Proceso de apoptosis por vía extrínseca

Adaptado de Igney, F. y Krammer P. (2002) *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis* [117]

En algunas células, denominadas tipo I, la cantidad de caspasa-8 activa formada en el DISC es suficiente para iniciar directamente la apoptosis. En las células de tipo II la cantidad de caspasa-8 es insuficiente y se utiliza a las mitocondrias como amplificadores de la señal apoptótica. La activación de las mitocondrias viene mediada por Bid, miembro de la familia Bcl-2.

En algunas circunstancias los receptores de muerte activan otras vías de señalización intracelular que no conducen a la apoptosis. Los receptores del TNF, por ejemplo, también pueden activar la vía de NF- κ B, que puede estimular la supervivencia celular y activar genes implicados en respuestas inflamatorias.

I.2.3.1.b Vía intrínseca o del estrés celular (o mitocondrial)

Las células también pueden activar su programa de apoptosis desde el interior de la célula, normalmente en respuesta a una lesión u otras formas de estrés, como el daño en el ADN, la hipoxia, la falta de nutrientes o de señales de supervivencia extracelulares.

La apoptosis a nivel mitocondrial se inicia por estimulación de la membrana mitocondrial, que se permeabiliza, y continúa a través de la liberación de citocromo c y otros factores apoptóticos del espacio intermembrana de la mitocondria. Esta liberación está controlada por las proteínas de la familia Bcl-2. En el citosol, el citocromo c forma un complejo con APAF1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1) y ATP llamado apoptosoma. Este complejo induce la activación de la caspasa-9.

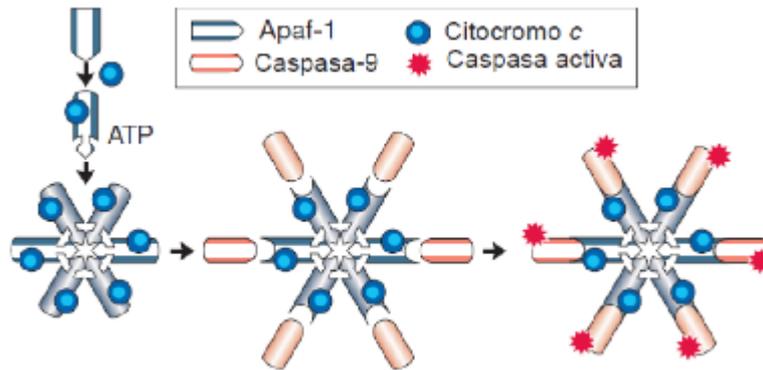


Figura I.26 Formación del apoptosoma y activación de la caspasa-9
Adaptado de Hengartner, M. (2000) *The biochemistry of apoptosis* [118]

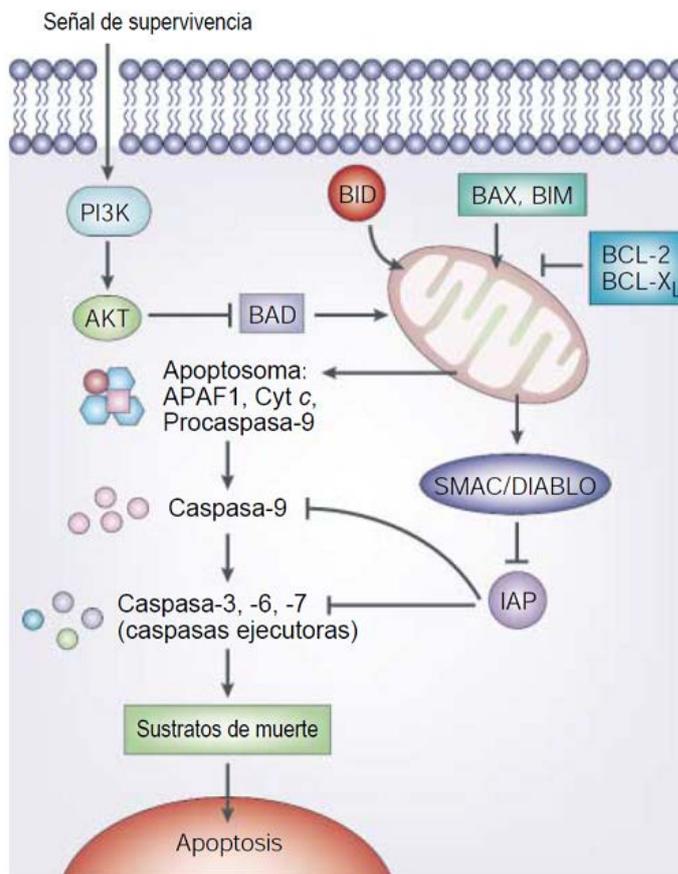


Figura I.27 Proceso de apoptosis por vía intrínseca
Adaptado de Igney, F. y Krammer P. (2002) *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis* [117]

Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la vía intrínseca de la apoptosis. La familia Bcl-2 se denomina así porque se encontró inicialmente en linfoma de células B-2 y contiene cuatro dominios de homología (BH) llamados BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales corresponden a segmentos de α -hélice. Podemos distinguir entre proapoptóticas y antiapoptóticas y se dividen en tres subfamilias: tipo Bcl-2 (antiapoptóticas), que poseen los cuatro dominios de homología; tipo Bax, que comparten con las Bcl-2 los dominios BH1, 2 y 3; y la subfamilia "sólo BH3" o dominio único BH3, que como su nombre indica sólo comparten homología de secuencia con Bcl-2 en el dominio BH3 [80], [119].

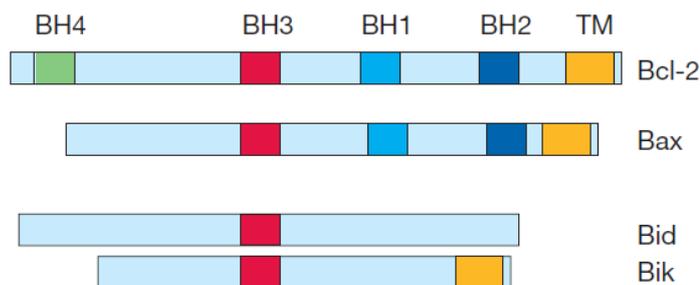


Figura I.28 Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2
Hengartner, M. (2000) *The biochemistry of apoptosis* [118]

Tabla I-2 Clasificación de la familia Bcl-2

	Subfamilia	Miembros
antiapoptótica	Bcl-2	Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, NR-13, Boo/DIVA,
proapoptótica	Bax	Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-X _s
	"sólo BH3"	Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, Bim _L /Bod, Bad, Bid, GL-1, Noxa, PUMA/Bbc3, Bmf

Estas proteínas pueden unirse entre sí en diversas combinaciones y formar heterodímeros en los que las dos proteínas se inhiben mutuamente. El equilibrio entre las actividades de estas dos clases funcionales de proteínas Bcl-2 determina en gran parte si la célula entra o no en apoptosis.

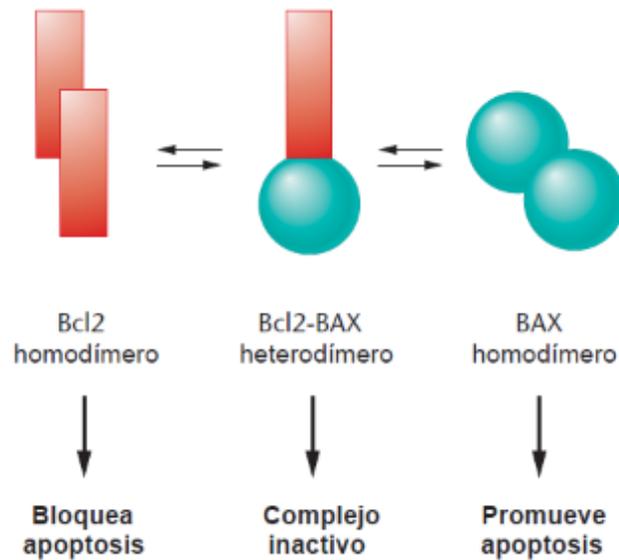


Figura 1.29 Equilibrio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas
Adaptado de Klug W. et al. (2012) *Concepts of genetics* [4]

La apoptosis vía intrínseca puede ser inhibida a diferentes niveles por proteínas antiapoptóticas, incluyendo las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), que están reguladas por SMAC/DIABLO (Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI). También puede ser inhibida a través de las señales de supervivencia, como factores de crecimiento o citoquinas, que activan la ruta de la quinasa fosfatidilinositol-3 (PI3K). PI3K activa AKT, que a su vez fosforila e inactiva la proteína proapoptótica Bad [117].

1.2.3.2 Muerte regulada de tipo II: Autofagia

La autofagia es el mecanismo por el cual las proteínas y los orgánulos deteriorados o aberrantes son secuestrados por unas vesículas de doble membrana (autofagosomas) y liberados en el interior de los lisosomas para su degradación.

También puede actuar como mecanismo de defensa frente a virus y bacterias patógenas. Cualquier objeto extraño u organismo que burle el sistema inmunitario extracelular, y consiga atravesar la membrana celular para llegar al citoplasma, se convierte en un objetivo potencial para el sistema autofágico [120].

Diversos tipos de estrés, como la isquemia, la hipoxia o la ausencia de factores de crecimiento, pueden proporcionar a la célula una señal de que faltan nutrientes. Ésta incrementa la autofagia, de modo que los autofagosomas buscan en el citoplasma proteínas y orgánulos que poder digerir para aprovechar los nutrientes y mantener las funciones celulares básicas.

La autofagia puede evitar la apoptosis accidental actuando como un mecanismo de seguridad. Entre los subproductos de la actividad mitocondrial se encuentran las especies reactivas del oxígeno

(ROS); el uso de estas especies puede provocar que parte del contenido mitocondrial se libere al exterior, incluidas las proteínas que constituyen la señal de inicio de la apoptosis, provocando la muerte accidental de la célula. Los autofagosomas evitan estos errores, retirando del citoplasma las mitocondrias dañadas y otros orgánulos.

Las terapias contra el cáncer tratan de inducir el suicidio de las células malignas; sin embargo, algunas células cancerosas eluden los tratamientos porque la autofagia retira las mitocondrias dañadas antes de que desencadenen la apoptosis. De hecho, la radiación y la quimioterapia inducen niveles de autofagia superiores a los normales. Las células cancerosas recurren a la autofagia para evitar la muerte por falta de nutrientes, por lo que la supresión de la autofagia en las células cancerígenas podría aumentar la eficacia de los tratamientos. Por otra parte, la supresión de la autofagia podría incrementar el número de mutaciones génicas en las células cancerosas, lo que aumentaría la probabilidad de recidiva.

La desregulación de la autofagia juega también un papel importante en otras patologías como las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson o Huntington), cardiomiopatías, miopatías y enfermedades infecciosas [108].

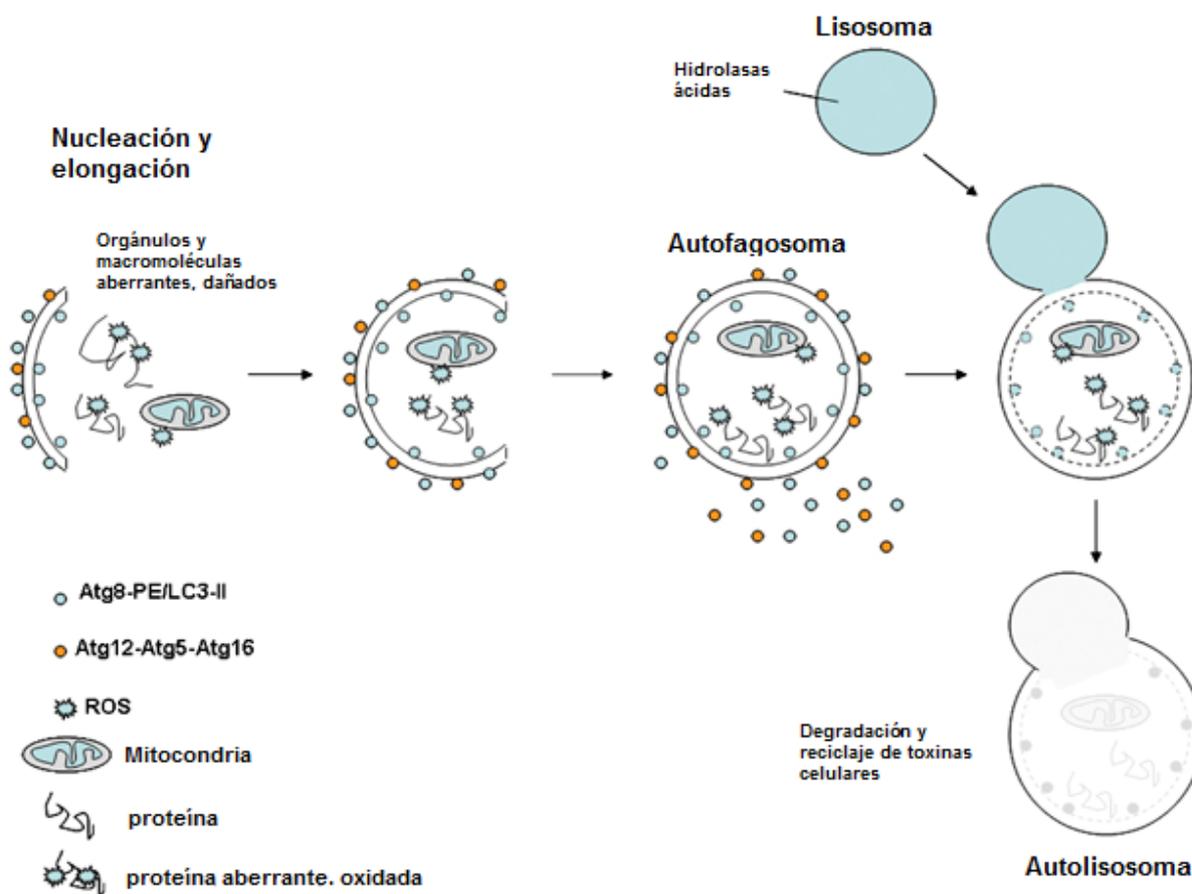


Figura I.30 Proceso de autofagia
Adaptado de Vellai, T. (2008) *Autophagy genes and ageing* [121]

1.2.3.3 Muerte no regulada: Necrosis

La necrosis es una muerte no regulada de las células. Se origina por una lesión aguda e irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Puede producirse debido a un traumatismo, a la exposición a radiaciones ionizantes, a la acción de sustancias químicas, a un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia) o falta de oxígeno (hipoxia), a una infección o a respuestas inmunológicas [122].

Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento. Las células aumentan su volumen debido a que el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) permanece abierto, permitiendo la rápida entrada de agua e iones, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. Las proteínas Bcl-2 impiden la apertura del mPTP, mientras que las proteínas tipo Bax favorecen su apertura. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos. La liberación del contenido celular provoca reacciones inflamatorias. La inflamación coadyuva a limitar la infección y eliminar los restos [108], [123], [124].

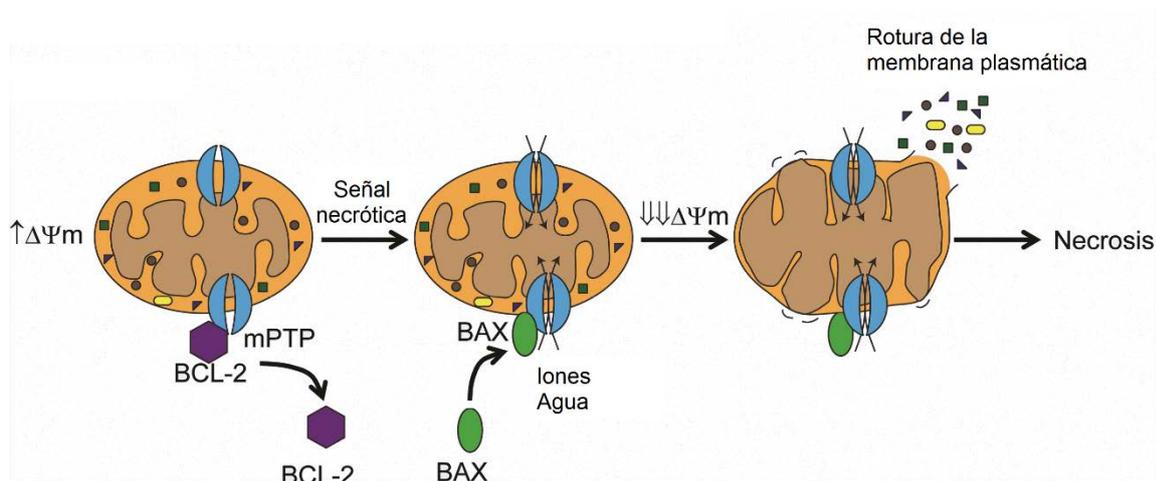


Figura 1.31 Proceso de necrosis

Adaptado de Kubli, D.A. y Gustafsson, A. B. (2012) *Mitochondria and Mitophagy* [124]

1.2.3.4 Catástrofe mitótica

La catástrofe mitótica es un tipo de muerte celular causada por la mitosis aberrante. Se asocia con la formación de células gigantes multinucleadas que contienen cromosomas no condensados y se distingue morfológicamente de la apoptosis, autofagia y necrosis [108].

El punto de control G₂ del ciclo celular es el responsable de bloquear la mitosis cuando la célula ha sufrido daños en su ADN, pero si el punto de control es defectuoso, la célula puede entrar en mitosis prematuramente, antes de que se haya completado la replicación del ADN o se hayan reparado los daños en el ADN. Esta mitosis aberrante hace que la célula muera por catástrofe mitótica.

Aunque los mecanismos moleculares que regulan la catástrofe mitótica no se han esclarecido, existen evidencias que apuntan que la survivina es una molécula clave en la regulación de la progresión mitótica. Estudios *in vitro* y con modelos animales sugieren que esta molécula mantiene el punto de control del huso mitótico, previniendo a las células estresadas de entrar en mitosis aberrante.

En la actualidad existen algunas terapias anticancerígenas dirigidas a inducir la muerte de las células tumorales por catástrofe mitótica. Algunos estudios sugieren que la pérdida de survivina junto con la inactivación de p53 podría tener efectos devastadores en la mitosis y esto podría llevar a la muerte de las células tumorales. Puesto que p53 se encuentra mutado en el 50% de los cánceres humanos, la inactivación de la survivina podría inducir catástrofe mitótica en las células tumorales que ya tuvieran p53 inactivo y que por tanto son resistentes a la apoptosis.

1.2.3.5 Evasión de la apoptosis en células tumorales

Como ya hemos comentado anteriormente, las células tumorales son capaces de evadir la apoptosis. El gen p53 y Bcl-2 juegan un papel importante en este proceso.

El gen p53 puede inducir a una célula dañada a suicidarse por apoptosis mediante la activación de la transcripción del gen Bax y la represión de la transcripción del gen Bcl-2. En las células normales, la proteína Bax está presente en un heterodímero con la proteína Bcl-2, y la célula permanece viable. Sin embargo, cuando los niveles de Bax aumentan en respuesta a la estimulación de p53, se forman homodímeros de Bax que promueven la apoptosis. Si p53 se encuentra mutado y no es funcional, los niveles de Bax no aumentan en respuesta al daño celular, y no se produce la apoptosis [4].

También hay relación entre algunas oncoproteínas y componentes de las rutas intrínseca y extrínseca de la apoptosis que promueven la tumorigénesis. Por ejemplo, la expresión de la oncoproteína E1A aumenta sinérgicamente la apoptosis inducida por Fas, TNF o TRAIL. De forma similar, la pérdida de función de APAF1 parece tener importancia en la transformación oncogénica de líneas celulares de melanoma y cáncer de ovario. También el oncogén myc está implicado en la muerte inducida por Fas en distintos tipos de células. La alteración de la ruta Fas, que regula el sistema inmune a través de su función proapoptótica, conduce a desordenes linfoproliferativos y cánceres hematopoyéticos. Se han encontrado mutaciones somáticas del gen Fas o de sus efectores *downstream* en pacientes con mieloma múltiple, linfoma No-Hodgkin y otros tipos de cáncer [108].

Las alteraciones de las rutas de supervivencia celular también son cruciales en la tumorigénesis porque pueden suprimir o alterar la apoptosis. Por ejemplo la ruta de señalización PI3K/AKT, que puede activarse a través de distintos estímulos intracelulares y extracelulares. Las señales de supervivencia incluyen factores de crecimiento como EGF y PDGF, citoquinas como IL-2 e IL-3, y algunas hormonas como la insulina. En general estas señales activan a PI3K, que fosforila al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) para generar el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato PtdIns(3,4,5)P₃. Esto conduce al reclutamiento de las quinasas PDK1, PDK2 (quinasas dependientes de PtdInsP₃ 1 y 2) y AKT a la membrana plasmática. En el complejo formado, PDK1 y PDK2 activan AKT por fosforilación. Una vez

activada, AKT controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las dianas que dependen de ella; la señalización de AKT induce la expresión de la molécula de anti-apoptótica Bcl-X_L e inhibe a la proteína pro-apoptótica Bad y a factores de transcripción como Afx y Fkhr1 (también conocido como Foxo3a) que inducen genes proapoptóticos. También activa la transcripción del factor nuclear κB (NF-κB), un factor de transcripción activado por numerosas citoquinas y oncogenes. La transcripción de genes de novo inducida por NF-κB previene la apoptosis mediada por receptores de muerte. Además, AKT promueve la translocación nuclear de Mdm2, de modo que regula negativamente la apoptosis mediada por p53. La ruta PI3K/AKT está regulada positivamente por Ras y negativamente por PTEN. PTEN es una fosfatasa supresora de tumores que antagoniza la acción de PI3K eliminando el fosfato-3 de PtdIns(3,4,5)P₃. La pérdida de función de PTEN es habitual en distintos tipos de cáncer, como glioblastoma, cáncer de endometrio y cáncer de próstata [80], [108], [117].

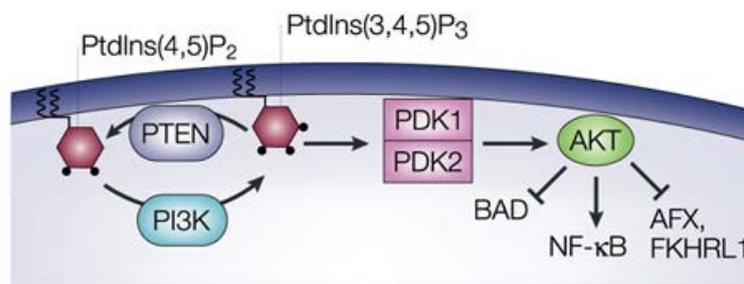


Figura 1.32 Ruta de señalización PI3K/AKT

Igney, F. y Krammer P. (2002) *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis* [117]

Como ya hemos comentado anteriormente, los tratamientos de quimioterapia y radioterapia actúan sobre las células tumorales induciendo su apoptosis, pero la alteración en los componentes de las vías de muerte celular con frecuencia genera resistencia. Estos componentes se convierten en potenciales dianas para el desarrollo de nuevos fármacos que restablezcan la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis.

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis por diversos mecanismos que interfieren en diferentes niveles de la señalización de la apoptosis. Uno de los mecanismos es la sobreexpresión de genes antiapoptóticos. Una característica común de linfoma folicular de células B es la translocación cromosómica t(14;18), que yuxtapone el promotor del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14, con el gen Bcl-2 en el cromosoma 18, dando lugar a una sobreexpresión de Bcl-2 [117], [125].

Bcl-2 coopera con la oncoproteína c-Myc, lo que contribuye a tumorigenesis. Algunos estudios han mostrado una correlación entre niveles elevados en la expresión de Bcl-2 y la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, se ha demostrado in vitro y en modelos in vivo que la expresión de Bcl-2 confiere resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia. En algunos tipos de tumores, un alto nivel de expresión de Bcl-2 está asociado con una mala respuesta a la quimioterapia y parece ser predictivo de un menor período supervivencia. Los virus oncogénicos de Epstein-Barr (VEB) y del herpes humano 8 (VHH-8 o virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi) codifican proteínas homólogas de Bcl-2 que poseen

actividad antiapoptótica y mejoran la supervivencia de las células infectadas; de este modo, contribuyen a la formación de tumores y a la resistencia de éstos a la terapia.

Otro de los mecanismos de resistencia a la apoptosis es mediante la sobreexpresión de IAPs, entre las que destaca la survivina. Podemos encontrar una elevada expresión de survivina en tejidos fetales y embrionarios, mientras que en tejidos normales completamente diferenciados no es detectable. Se han detectado niveles elevados de survivina en cáncer colorrectal, de esófago, y sarcoma de tejidos blandos y se han correlacionado con características clínicas. La expresión de survivina también ha sido asociada con un mal pronóstico en diversos tumores del sistema nervioso central (SNC), incluyendo gliomas. También se han detectado niveles de survivina en carcinomas de estómago, páncreas, hígado, útero y en feocromocitomas, aunque su importancia pronóstica todavía no está clara [80].

Se ha propuesto la activación de Myc, que induce la expresión de numerosas quimiocinas que atraen a las células inflamatorias, conduce a la producción de TNF- α en el microambiente tumoral. Niveles elevados de cIAP1 y cIAP2 en células tumorales funcionan como mediadores clave en la activación de NF- κ B inducida por TNF- α y las protegen de los efectos letales de TNF- α .

Hay varios estudios clínicos en fase I que tratan de bloquear las IAP como terapia anticancerígena. En la actualidad se están probando en el tratamiento de tumores sólidos avanzados y linfomas.

I.3 Papel del estrés oxidativo en la carcinogénesis

I.3.1 Introducción. Concepto de radical libre

Los radicales libres son especies químicas muy reactivas que poseen, al menos, un electrón desapareado. Un electrón desapareado es aquel que ocupa él solo un orbital.

Un radical se puede generar de tres formas:

- Transferencia electrónica: adición de un electrón. $A + e^- \rightarrow A^{\bullet-}$ [I.1]
- Rotura heterolítica: pérdida de un electrón. $A : B \rightarrow \ddot{A}^- + B^+$ [I.2]
- Rotura homolítica de un enlace covalente $A : B \rightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$ [I.3]

La transferencia electrónica es la más común en los sistemas biológicos ya que la rotura homolítica requiere una gran cantidad de energía procedente de elevadas temperaturas, radiación UV o ionizante. La rotura heterolítica no produce radicales libres, sino iones cargados [126]

La presencia de electrones desapareados hace que estas especies sean muy reactivas, por lo que su vida media es muy corta. La vida media del radical hidroxilo \cdot OH es de aproximadamente 10^{-9} segundos [127].

La formación de radicales libres es un proceso continuo donde si no se encuentran inhibidores presentes, puede continuar como una reacción en cadena indefinida. Empezando con un compuesto orgánico RH, podemos distinguir tres fases [128]:

- Iniciación: El compuesto orgánico pierde un electrón y da lugar a un radical. Una vez formado, puede reaccionar con otro radical libre o con O₂.



- Propagación: Un radical reacciona con una especie no radicalaria y esta última adquiere su carácter, dando lugar a una reacción radicalaria en cadena. En los seres vivos, un radical puede reaccionar con oxígeno o con proteínas, lípidos o carbohidratos.



- Terminación: dos radicales reaccionan y forman especies estables.



1.3.2 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es el elemento químico más abundante en la corteza terrestre (47,7% en peso) y también en todos los seres vivos. Podemos distinguir dos especies inorgánicas del oxígeno de enorme importancia para la vida: el agua, H₂O, y el oxígeno molecular, O₂. La mayoría de los organismos utilizan el O₂ como oxidante metabólico para producir la energía necesaria en sus procesos vitales (organismos aeróbicos), por lo que es un elemento necesario. Paradójicamente el O₂ es tóxico, aunque debido a que es cinéticamente inerte a temperatura ambiente no se produce de forma espontánea la oxidación de los compuestos orgánicos que constituyen a los seres vivos. Los efectos nocivos del oxígeno no se manifiestan en una atmósfera normal porque los organismos aerobios poseen sistemas de defensa, pero si la concentración atmosférica aumenta, se producen importantes daños celulares, pudiendo llevar a la muerte del organismo [129].

Todas las reacciones bioquímicas del O₂ necesitan ser catalizadas, principalmente por metaloenzimas de hierro (Fe) y cobre (Cu), para que puedan producirse rápidamente en condiciones fisiológicas.

La configuración electrónica del oxígeno se desdobra en tres términos diferentes. El término fundamental, ³Σ_g⁻, es un estado triplete con dos electrones desapareados, mientras que los dos términos excitados (¹Δ_g y ¹Σ_g⁺) son singletes, no tienen electrones desapareados. De los dos, sólo el término ¹Δ_g tiene una vida media suficientemente larga (10⁻³ – 10⁻⁶ segundos) para tener importancia química, por lo que se le denomina oxígeno molecular singlete (O₂¹).

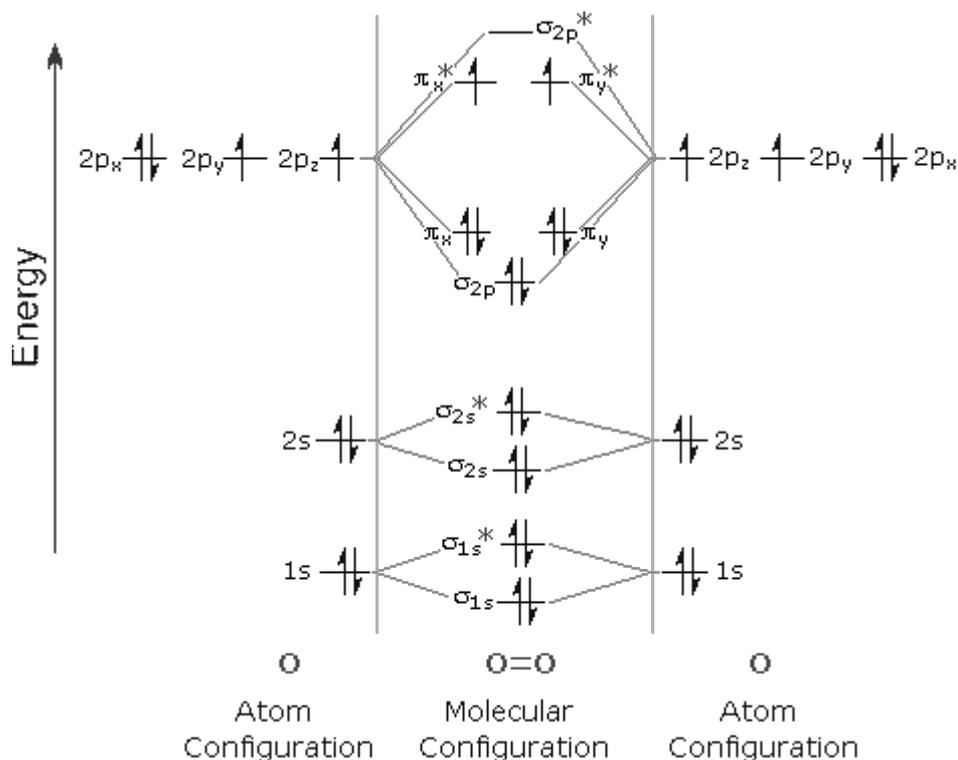
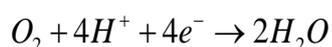


Figura I.33 Diagrama de orbitales moleculares del oxígeno [130]

I.3.2.1 Oxígeno molecular singlete (O_2^1)

El O_2^1 es mucho más oxidante y más reactivo que el O_2 , siendo capaz de oxidar muchos compuestos orgánicos a presión y temperatura ambiente. No puede formarse por absorción directa de fotones de la luz solar, pero sí en presencia de ciertas sustancias (sensibilizadores), como las porfirinas, que son capaces de transferirle su propia energía de excitación electrónica. El O_2^1 puede producir efectos patológicos en los seres humanos. Es el caso de la protoporfiria eritropoyética, una enfermedad en la que los pacientes poseen en los glóbulos rojos protoporfirina IX libre. Esta porfirina actúa como sensibilizador, induciendo la formación de O_2^1 que a su vez oxida diversos componentes de la membrana celular produciendo su ruptura y por lo tanto la destrucción de los glóbulos rojos. El oxígeno singlete se utiliza en el tratamiento de algunos tipos de cáncer; se inyecta por vía intravenosa un fotosensibilizador que es retenido específicamente por las células cancerígenas pero no por las sanas, se dejan pasar dos o tres días para que se fije en el tumor y se irradia con luz visible para que se produzca su necrosis. Esta terapia se denomina terapia fotodinámica [129].

En el metabolismo aerobio entre un 1-5% del oxígeno que consumimos se reduce parcialmente, es decir, de forma incompleta, dando lugar a intermediarios o especies reactivas (ROS) [127]. El oxígeno restante se reduce a agua mediante una transferencia de cuatro electrones.



[I.7]

Además del O_2^1 , existen otras ROS de importancia química y bioquímica.

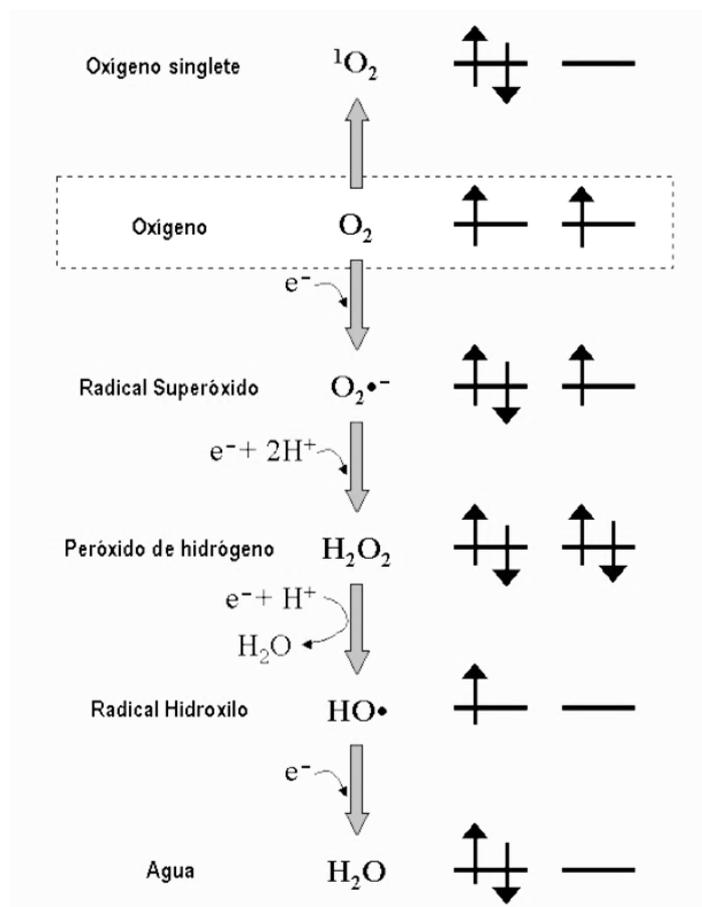


Figura I.34 Formación de ROS
Adaptado [131]

I.3.2.2 Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

La adición de un electrón a la molécula de O_2 origina el radical superóxido $O_2^{\bullet-}$, una especie muy reactiva con un único electrón desapareado. Se genera mediante la autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles. Tetrahydropterinas, hemoproteínas y ferredoxinas y en el interior de orgánulos celulares como los cloroplastos y las mitocondrias.

Puede actuar tanto como agente reductor como oxidante. Su dismutación da lugar a la especie no paramagnética peróxido de hidrógeno H_2O_2 , o agua oxigenada, que carece de electrones desapareados.



I.3.2.3 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El gran poder oxidante del H_2O_2 en disolución acuosa explica su utilidad como antiséptico. Se forma principalmente en la mitocondria en la cadena de transporte electrónico. También como producto de la acción de las superóxido dismutasas (SOD) o de la oxidación de quinonas, entre otros [128].



Se dismuta espontáneamente.



I.3.2.4 Radical $\bullet OH$

El radical hidroxilo es mucho más reactivo que el radical superóxido. Reacciona fácilmente con compuestos orgánicos. Su formación transcurre a través de la reacción de Fenton:



y la oxido-reducción cíclica del metal por parte del superóxido:



siendo la suma de ambas reacciones, conocida como reacción de Haber-Weiss:



I.3.2.5 Radicales alcóxido ($RO\bullet$) y radicales peróxido ($ROO\bullet$)

Otras especies reactivas de oxígeno son los radicales alcóxido ($RO\bullet$) y peróxido ($ROO\bullet$).

I.3.3 Especies reactivas de nitrógeno

El nitrógeno es el cuarto elemento químico por orden de abundancia en los seres vivos, después del oxígeno, carbono e hidrógeno. El nitrógeno biológico es nitrógeno reducido N (-III) y forma parte de una variedad de compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Dentro del grupo de las especies reactivas del nitrógeno destaca el óxido nítrico ($NO\bullet$). Es especialmente tóxico por su gran afinidad por la hemoglobina, bloqueando el aporte de oxígeno a las células. Se genera en los tejidos biológicos por las sintasas de óxido nítrico (NOSs), las cuales metabolizan la arginina a citrulina con la formación de $NO\bullet$ mediante una reacción de oxidación con cinco electrones. El $NO\bullet$ actúa como molécula de señalización en diversos procesos biológicos, incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión arterial (actúa como vasodilatador), relajación de la musculatura de fibra lisa y regulación inmunológica (actuando como agente citotóxico en macrófagos). Es soluble en medio acuoso y lipídico, lo cual permite su difusión a través del citoplasma y la membrana plasmática [129], [132].

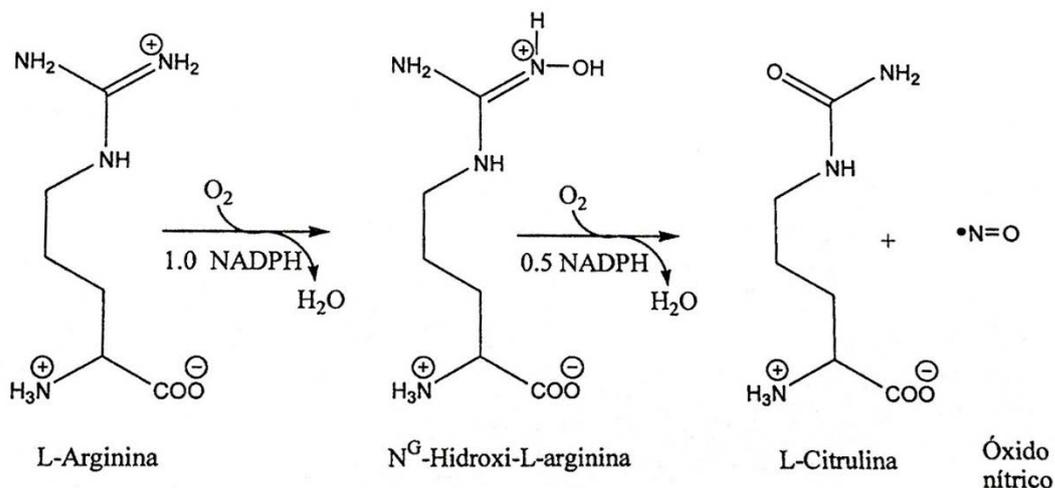


Figura 1.35 Biosíntesis del NO a partir de la arginina
Vallet, M. et al (2003) *Introducción a la Química Bioinorgánica* [129]

La concentración de $NO\bullet$ en los tejidos que lo sintetizan es muy pequeña (μM en el caso de los macrófagos y nM en neuronas y células endoteliales) y debe estar estrictamente regulada. Una producción insuficiente produce hipertensión, impotencia, arterioesclerosis y una gran susceptibilidad a sufrir infecciones. En cambio, una producción excesiva lleva a choque séptico, artritis reumática, rechazo a trasplantes, esclerosis múltiple, carcinogénesis, etc.

Las NOS neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) son constitutivas, es decir, se encuentran de permanente en las células pero sólo sintetizan NO cuando son activadas por la metaloproteína calmodulina, mientras que la NOS de los macrófagos (iNOS) es inducible, es decir, sólo se sintetiza cuando se inicia la fagocitosis y produce NO de forma continua.

Para acometer su actividad enzimática, las isoformas constitutivas dependen de Ca^{2+} y calmodulina. La unión de L-arginina, BH4 y el grupo hemo promueven la dimerización de tales proteínas. La unión posterior del complejo Ca^{2+} /calmodulina produce un cambio conformacional en el dímero, quedando la enzima funcionalmente activa. La producción de NO por estas isoformas se insta con el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que provoca una liberación rápida y transitoria de cantidades moderadas de óxido nítrico [133].

Para su actividad catalítica, la isoforma inducible requiere la presencia de varios cofactores: NADPH (Nicotinamida adenín-dinucleótido fosfato reducida), FAD (Flavín adenín dinucleótido), FMN (mononucleótido de flavina), glutatión y BH4, que intervienen como transportadores de electrones. Algunos de estos cofactores promueven la unión de la enzima a su sustrato, la L-arginina. En presencia del sustrato, aumenta la estabilidad de la proteína.

Se ha vinculado el NO con fenómenos de plasticidad sináptica relativos al desarrollo y almacenamiento cerebral de la información (memoria). Según parece, el NO se implica en la plasticidad sináptica a través de un mecanismo de potenciación: el radical libre potencia la liberación de neurotransmisores. Las neuronas glutamatérgicas liberan el neurotransmisor glutamato al espacio

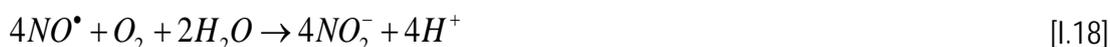
sináptico y éste se une a los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la membrana postsináptica. La activación de los receptores de NMDA induce el aumento de Ca^{2+} citoplasmático, que, a su vez, activa a la nNOS en la neurona postsináptica para producir óxido nítrico. Este NO llega por difusión a la neurona presináptica y facilita la liberación de más glutamato.

La molécula de $NO\cdot$ posee un electrón desapareado en el orbital antienlazante $2\pi_y^*$ y por tanto es un radical. Su comportamiento químico viene dado por sus reacciones redox, puede oxidarse y reducirse con facilidad, y por su papel como ligando frente a los iones de los metales de transición.

Reacciona con el radical superóxido $O_2^-\cdot$ para dar peroxinitrito, un radical con mayor poder oxidativo que puede causar rotura en el ADN y oxidación lipídica. A pH neutro se protona a ácido peroxinitroso, HOONO, especie muy inestable que se descompone para dar ácido nítrico. También puede originar NO_2 y radicales hidroxilo.



El NO reacciona fácilmente con el oxígeno molecular. En fase gaseosa da lugar al NO_2 mientras que en disolución acuosa se transforma en anión nitrito.



Por otra parte, el NO oxida al peróxido de hidrógeno, generando oxígeno singlete



El NO_2 conduce a la formación de tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4) y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que igual que el ácido nitroso (HNO_2) son especies muy reactivas en fase acuosa y donadores de cationes nitrosonio (NO^+), los cuales pueden transferirse a diferentes nucleófilos produciendo nitrosaminas y nitrosotioles (SNO).



Otras RNS son el catión nitronio (NO_2^+) y los peroxinitritos de alquilo (ROONO).

I.3.4 Fuentes de especies reactivas

Las principales fuentes de ROS incluyen las mitocondrias, el retículo endoplasmático, la membrana plasmática y el citosol, mientras que en el caso de las RNS se forman principalmente en el citosol y las mitocondrias [134].

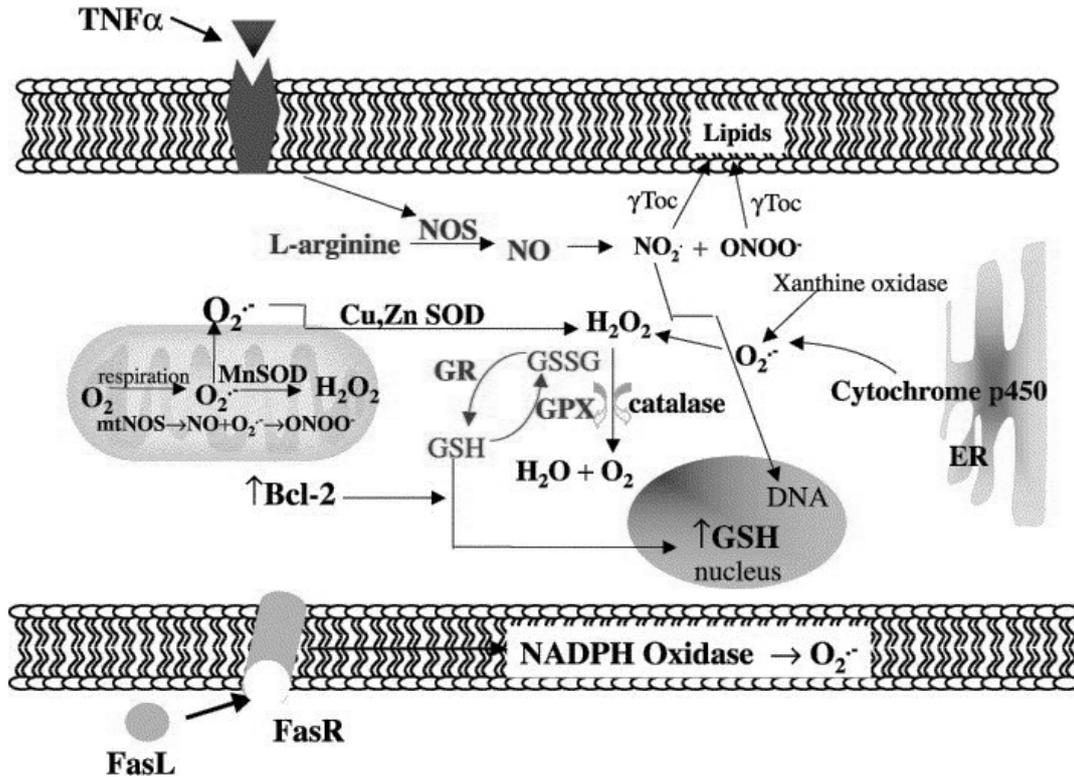


Figura I.36 Fuentes de ROS intracelulares

Curtin, J.F. et al. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis [134]

I.3.4.1 Mitocondria

La mitocondria es el orgánulo celular responsable de la respiración aeróbica. Provee energía a los tejidos en forma de ATP a través de la cadena de transporte electrónico. El oxígeno es reducido a agua por la citocromo oxidasa en un 95-99%, mientras que el 1-5% restante se reduce parcialmente dando H $_2$ O $_2$ y O $_2$ ·- [135]. El O $_2$ ·- se transforma en H $_2$ O $_2$, ya sea en condiciones fisiológicas o acelerada por las SOD.

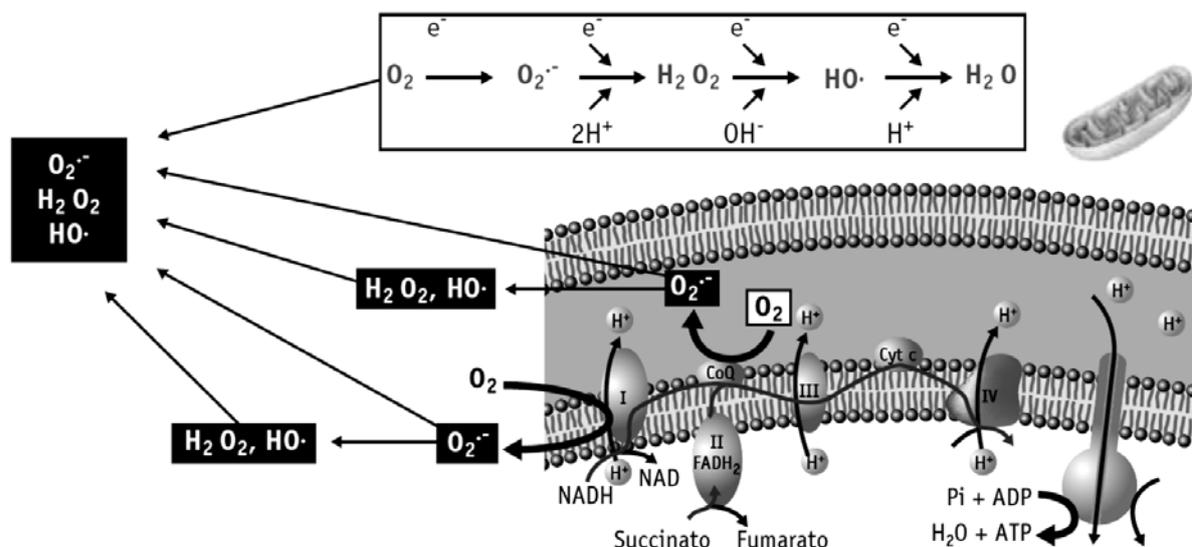


Figura I.37 Generación de ROS en la cadena de transporte electrónico
Valls, V. (2005) *Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante in vivo* [136]

I.3.4.2 Retículo endoplasmático y peroxisomas

Los peroxisomas son orgánulos que tienen un papel fundamental en el metabolismo lipídico y están encargados de la degradación de ácidos grasos de cadena larga para su completa oxidación en la mitocondria. Además, participan en la degradación de bases púricas de los aminoácidos (adenina y guanina) y juegan un papel importante en la detoxificación de moléculas tóxicas como el etanol [137].

Los procesos de degradación que ocurren en los peroxisomas son realizados por numerosas enzimas de tipo oxidasa que utilizan oxígeno molecular para conseguir átomos de hidrógeno de sustratos específicos generando como consecuencia grandes cantidades de H_2O_2 . Los peroxisomas son la principal fuente de H_2O_2 intracelular.

Todas las oxidasas peroxisomales, a excepción de la oxidasa de urato, son flavoproteínas, es decir, proteínas que contienen un ácido nucleico derivado de la riboflavina: FMN o FAD.

La citocromo P450 reductasa y la citocromo b5 reductasa están presentes en el retículo endoplasmático y las membranas nucleares y catalizan las reacciones de desaturación, desmetilación e hidroxilación de sustancias. Normalmente requieren $NADPH$ y $NADH$ (nicotinamida adenina dinucleótido). La oxidación de $NADPH$ puede dar una reducción incompleta del O_2 dando lugar a $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 [138].

I.3.4.3 “Estallido respiratorio”

Las células fagocíticas, como los neutrófilos, cuando reconocen determinadas partículas extrañas (por ejemplo, bacterias) producen una serie de reacciones que liberan gran cantidad de ROS. Este proceso se denomina “estallido respiratorio” o “explosión respiratoria”. La explosión respiratoria juega un papel muy importante en el sistema inmune, ya que se utiliza para degradar los microorganismos fagocitados.

El estallido respiratorio tiene cuatro enzimas implicadas: NADPH oxidasa, SOD, NOS y mieloperoxidasa (MPO). La actividad de la NADPH oxidasa produce $O_2^{\cdot-}$ para la destrucción bacteriana. El $O_2^{\cdot-}$ espontáneamente se recombina con otras moléculas para producir ROS. La actividad de SOD, NOS y MPO producen H_2O_2 , NO^{\cdot} y HOCl respectivamente. Posteriormente se identificó otra ruta oxidativa donde las células fagocíticas convierten nitritos NO_2^- en cloruro de nitrilo NO_2Cl y NO_2 a través de la MPO o del propio HOCl, produciendo la nitración de las moléculas diana [139].

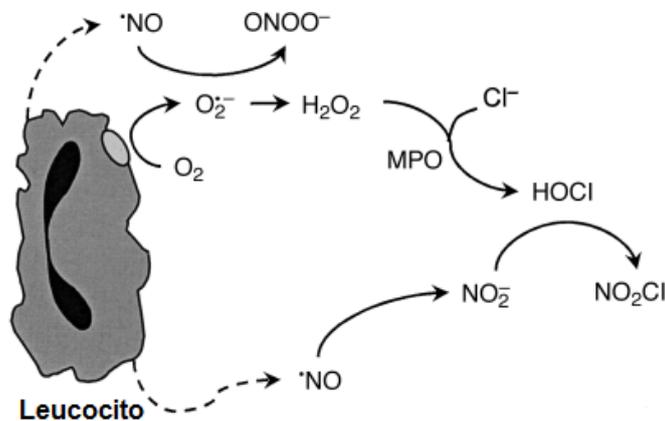


Figura I.38 ROS generadas por leucocitos activados
Adaptado de Himmelfarb, J. et al. (2002) “The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia” [139]

I.3.4.4 Oxidación de pequeñas moléculas

Como ya hemos comentado, el $O_2^{\cdot-}$ también se genera mediante la autooxidación de leucoflavinas, hidroquinonas, catecolaminas, tioles. Tetrahidropterinas, hemoproteínas y ferredoxinas.

I.3.4.5 Enzimas citosólicas

La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario celular, como la aldehído oxidasa involucrada en el metabolismo del etanol y la óxido nítrico sintasa responsable de transformar la L-arginina en óxido nítrico y enzimas unidas a la membrana plasmática como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (COX) que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, también generan radicales libres durante el ciclo de catálisis [140].

Otro ejemplo es la Xantina oxidasa (XO), implicada en la hidroxilación de purinas, que cataliza la reacción de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico utilizando NAD^+ como aceptor de electrones. Ambas reacciones generan $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 [141].

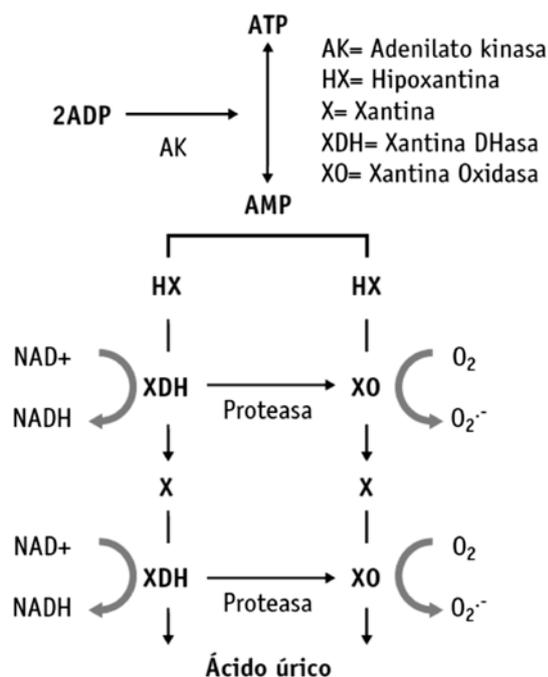


Figura I.39 Generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por el sistema de la XO

Valls, V. (2005) *Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante in vivo* [136]

Durante la isquemia se suprime el aporte de oxígeno, lo que implica una inhibición en la cadena de transporte electrónico. Una de las vías que se utiliza como alternativa para el suministro de energía es el ciclo de los purin nucleótidos, mediante la activación del enzima adenilato quinasa. A consecuencia de una serie de variaciones electrónicas se produce una hipercalcemia que conduce a la activación de varias proteasas citoplasmáticas que transforman la xantina DHasa en xantina oxidasa, la cual en presencia de O_2 formará el $\text{O}_2^{\cdot-}$ [136].

I.3.5 Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo

Los sistemas de defensa contra los radicales libres los constituyen los antioxidantes. Se define como antioxidante a las estructuras moleculares capaces de prevenir o evitar la oxidación de otras moléculas, ya sea por interacción y estabilización de especies reactivas, o por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida [127], [140].

Los antioxidantes poseen una importante función homeostática y pueden dividirse en dos grandes grupos: un primer grupo constituido por moléculas de estructura compleja y elevada masa molecular, que constituyen los sistemas enzimáticos responsables de la capacidad antioxidante celular, y un segundo grupo constituido por moléculas de menor tamaño y masa molecular.

I.3.5.1 Sistema enzimático

Al primer grupo pertenecen las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (Cat.) y la glutación peroxidasa (GPx).

- Superóxido dismutasas (SOD): Familia de metaloproteínas que catalizan la reacción de dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 es metabolizado principalmente por la catalasa, aunque también por las peroxidasas.



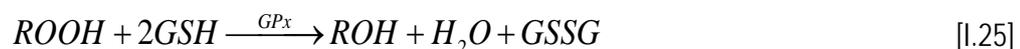
En 1938 fue aislada por primera vez la superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) [142] pero no fue hasta 1969 cuando cuando McCord y Fridovich demostraron su actividad antioxidante [143]. La Cu/Zn-SOD se localiza en el citosol de las células eucariotas y en los cloroplastos de las plantas. Posteriormente se descubrieron la superóxido dismutasa de hierro, FeSOD (localizada en cianobacterias y en los cloroplastos de las plantas), y la de manganeso, MnSOD (localizada en las mitocondrias y en las células bacterianas). Recientemente se ha descubierto una SOD de níquel (NiSOD) presente en bacterias [144].

En la especie humana, existen tres formas de SOD: Las SOD1 y SOD3 son superóxido dismutasas de cobre y zinc y están presentes en el citoplasma y el líquido extracelular, mientras que la SOD2 es una superóxido dismutasa de manganeso y se encuentra en las mitocondrias. Mutaciones en la SOD1 se han asociado con ELA (esclerosis lateral amiotrófica) familiar [145].

- Catalasa (Cat): Es una hemoproteína tetramérica que metaboliza el peróxido de hidrógeno. Tiene una tasa de renovación superior a $4 \cdot 10^4$ moléculas/segundo [144]. Se localiza en los peroxisomas.



- Glutación peroxidasas (GPx): Las peroxidasas reducen al H_2O_2 y a los peróxidos orgánicos durante la oxidación de un sustrato orgánico. En el caso de la glutación peroxidasa, utiliza la oxidación del glutación GSH. Existe en dos variantes moleculares, dimérica (independiente de Se) y tetramérica, que contiene selenocisteína. Se encuentra mayoritariamente en la mitocondria aunque también está presente en el citosol. Desempeña un importante papel antioxidante en la protección de los eritrocitos.



I.3.5.2 Sistema no enzimático

Al segundo grupo pertenecen especies como el α -tocoferol (Vitamina E), el ácido ascórbico (Vitamina C), el glutatión reducido (GSH), los β -carotenos (Vitamina A) o el ácido úrico, entre otras.

- La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en una concentración muy elevada en numerosos tejidos y en el plasma. Es la molécula antioxidante más abundante en las plantas. Es uno de los antioxidantes más potentes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico. Presenta una configuración en la que los grupos hidroxilos funcionan como agentes con alto potencial reductor. Actúa frente a las especies moleculares $O_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} , H_2O_2 y O_2^1 , oxidándose a dehidroascorbato. Actúa sinérgicamente con otros *scavengers* como la vitamina E o el GSH para devolverlos a su forma reducida.

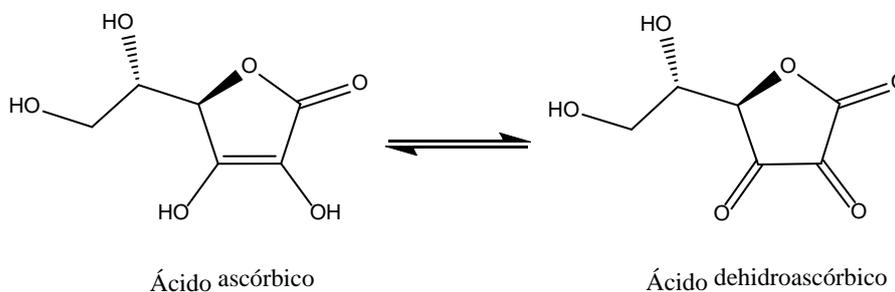


Figura I.40 Vitamina C en su forma reducida y oxidada

- La vitamina E engloba una pequeña familia de compuestos, de los cuales el más común es el α -tocoferol. Es el principal compuesto antioxidante liposoluble que desempeña una función importante en la prevención del daño a las membranas por peroxidación lipídica. Neutralizan los radicales peroxilo [146].

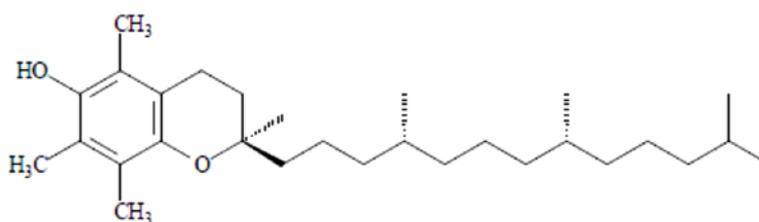


Figura I.41 Estructura de la vitamina E

- Carotenoides: Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y junto con la vitamina E, son los antioxidantes liposolubles más importantes de las membranas celulares. Los β -carotenos y el licopeno son algunos de los carotenoides más importantes. Desactivan mediante *quenching* moléculas como el O_2^1 . Los β -carotenos disminuyen la tasa de formación de hidroperóxidos de linoleato de metilo y parecen poseer propiedades anticancerígenas [146].

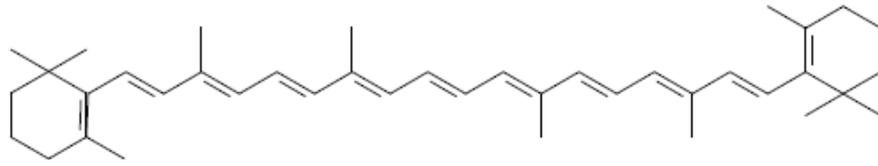


Figura I.42 Estructura de los β -carotenos

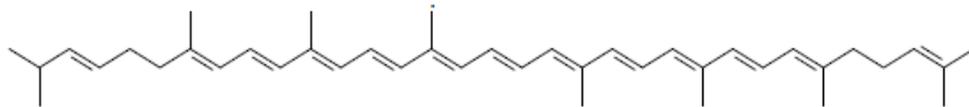


Figura I.43 Estructura del licopeno

- Tioles: Actúan como antioxidantes intracelulares neutralizando a los radicales libres y a través de reacciones enzimáticas. El glutatión (GSH) es el tiol intracelular más importante y nos centraremos en él más adelante.
- Compuestos fenólicos: entre los que destacan los flavonoides y los estilbenos. Se encuentran en frutas, verduras, semillas, tallos y flores y son, por tanto, constituyentes importantes de la dieta humana. Hablaremos de ellos en profundidad en apartados posteriores.

Los estudios epidemiológicos sugieren que los antioxidantes de la dieta pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento [147].

I.3.6 Telómeros, senescencia, envejecimiento y cáncer

Podemos entender la senescencia como un proceso protector, ya que previene el acumulo de lesiones genéticas aberrantes en las células de la descendencia. La evidencia experimental obtenida en estos últimos años mantiene que la senescencia también juega un papel importante en el proceso de envejecimiento. Se ha postulado que podría contribuir al mismo mediante dos mecanismos: el acúmulo de células senescentes en los tejidos diferenciados y la reducción del potencial regenerativo de las células madre.

Los telómeros son los extremos de los cromosomas. Para los seres humanos el ADN telomérico consiste en una secuencia simple rica en Guanina, TTAGGG, que se extiende en sentido 5' \rightarrow 3' desde el ADN de doble cadena hacia el final del cromosoma finalizando en una hebra simple 3'. Este extremo 3' genera junto con otras proteínas una estructura de T-loop que protege el telómero [7], [23]. Estas proteínas se conocen con el nombre de shelterinas y se encargan de proporcionar estabilidad y protección a los telómeros, y algunas de ellas participan activamente en su replicación y cohesión durante las distintas fases del ciclo celular. El grupo de shelterinas está formado por TRF1 (factor de repetición telomérica 1), TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 y POT1 (factor de protección de los telómeros 1) [148].

El predominio de guaninas (G) en las regiones teloméricas convierte a estas estructuras en dianas de radicales $\cdot\text{OH}$ y su posterior modificación oxidativa, lo que produce un material genético propenso a la aparición de mutaciones.

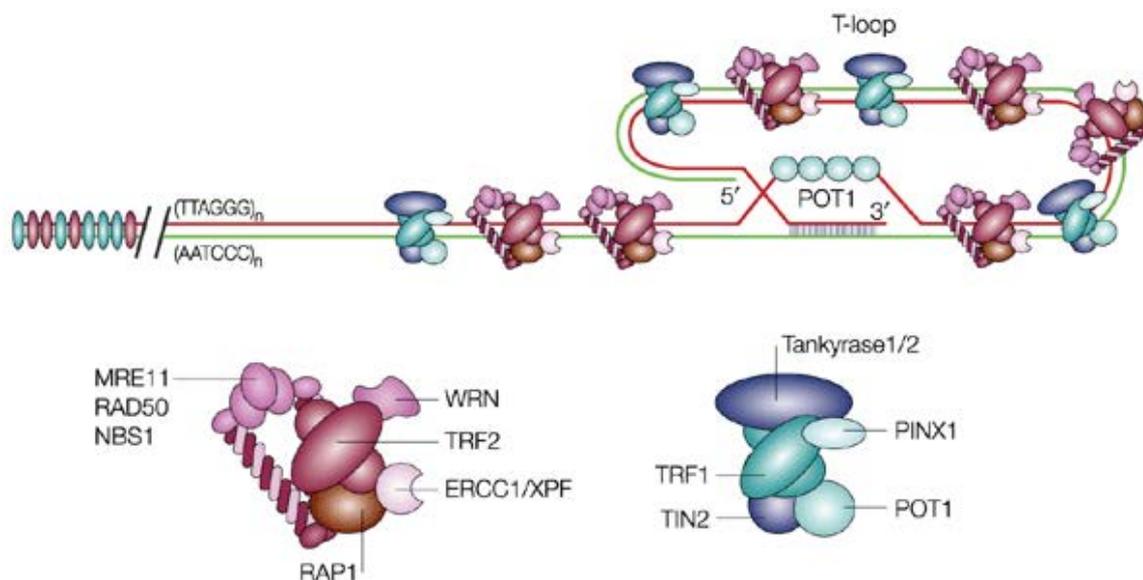


Figura I.44 Estructura de los telómeros
De Lange, T. (2004) *T-loops and the origin of telomeres* [149]

Los telómeros preservan la estabilidad cromosómica, protegiendo el extremo final del cromosoma de la degradación y de las fusiones cromosómicas. En cada ciclo replicativo los telómeros se acortan a causa del problema intrínseco de la replicación de los extremos (fenómeno conocido en inglés como "end replication problem") [148]. Este problema fue descrito por Olovnikov en 1971 y por Watson en 1972 de manera independiente [150].

Cuando las células replican sus cromosomas, que están formadas por dos cadenas de ADN enrolladas una sobre la otra, el primer paso consiste en separar esa doble hélice. Las ADN polimerasas utilizan las dos cadenas parentales como molde para construir una nueva compañera. Olovnikov y Watson observaron que las ADN-polimerasas eran incapaces de copiar en su totalidad los extremos de los cromosomas lineales. Las cadenas de ADN "hijas" eran más cortas en el extremo 5'. Esto se debe a que las ADN polimerasas sólo pueden actuar en sentido $5' \rightarrow 3'$, la síntesis de la cadena en sentido contrario se realiza de forma discontinua mediante fragmentos de Okazaki, que se inician a partir de un cebador de ARN. Después de la eliminación del cebador de ARN y de la extensión y ligación de los fragmentos sintetizados, el fragmento de Okazaki localizado más próximo al extremo 3' es incompleto, dado que el último cebador de ARN no puede sustituirse por ADN.

Si las células no compensasen esta pérdida de material genético, los cromosomas se acortarían con cada división celular, produciendo la eliminación completa de los telómeros y algunos genes decisivos, lo que conduciría a la muerte celular y el fin de su linaje. Las especies unicelulares así como las células de la línea germinal debían tener un mecanismo para contrarrestar este acortamiento [151].

En 1984, Carol W. Greider y Elizabeth H. Blackburn consiguieron demostrar la existencia de la telomerasa, una enzima capaz de elongar los telómeros sin el apoyo de un molde previo de ADN. La telomerasa está formada por una estructura proteica que presenta la actividad catalítica de polimerasa en reverso de ADN (el componente TERT, del inglés Telomeric End Reverse Transcriptase) y también posee un fragmento de ARN de secuencia complementaria a las repeticiones teloméricas que se van a añadir, que la telomerasa utiliza a modo de molde sobre el que copiar los fragmentos que añadirá a las repeticiones preexistentes (el componente Terc o TR, del inglés Telomerase RNA component) [148].

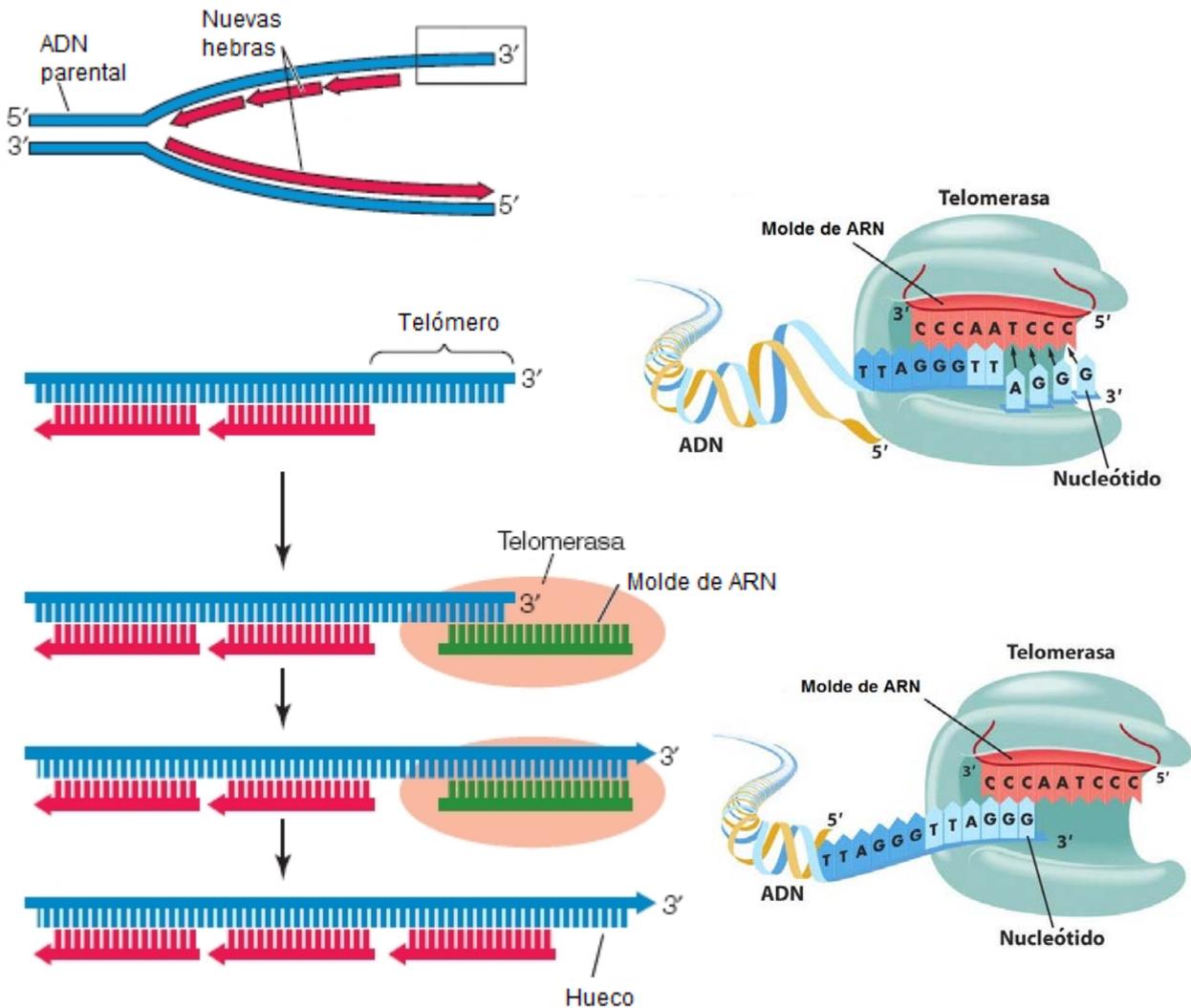


Figura 1.45 Solución del problema de la telomerasa
Adaptado de [152] y [153]

La telomerasa se coloca junto al extremo de la cadena de ADN y va añadiendo nucleótidos hasta formar una subunidad telomérica. Cuando la subunidad está completa, la telomerasa puede deslizarse hacia el nuevo extremo del cromosoma y agregar una nueva subunidad, repitiendo el proceso de síntesis [151].

La telomerasa no se encuentra en las células somáticas maduras, lo que produce un acortamiento de los telómeros después de cada división celular. Cuando los telómeros adquieren una longitud suficientemente corta, crítica, las células normales frenan irreversiblemente la proliferación y adquieren una morfología alargada y una variedad de funciones alteradas. La respuesta senescente supone no solo un freno en el crecimiento irreversible sino también cambios selectivos en funciones diferenciadas relacionadas con la integridad, función y homeostasis de los tejidos.

La mayoría de los tejidos humanos no muestran actividad de la telomerasa; se encuentra presente en las células germinales y en las líneas celulares inmortalizadas, donde se mantiene constante la longitud de los telómeros. El 85% de las líneas de células tumorales mantienen la longitud de los telómeros y expresan altos niveles de la telomerasa. Estas evidencias parecen indicar que existe una fuerte correlación entre la activación de la telomerasa y la estabilización de los telómeros, que es crucial para la inmortalización de la célula y en la tumorigénesis [7]. Diversos estudios han demostrado utilizando líneas celulares que existe una correlación entre la expresión del gen hTERT y la actividad enzimática de la telomerasa [80], [154].

Actualmente se propone que la telomerasa puede ser necesaria para proteger los extremos de los cromosomas de modo que no sean reconocidos como roturas de ADN que pondrían en marcha la maquinaria de parada del ciclo celular y/o apoptosis [155].

Se ha postulado que los telómeros contribuyen a la iniciación y progresión de tumores malignos. La disfunción, ya sea a causa de los acortamientos, por daño directo, o defectos en la telomerasa asociado a proteínas, puede tener tres resultados: senescencia, muerte, o inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica predispone a las células a la transformación neoplásica. La senescencia celular y la muerte celular pueden ser consideradas respuestas supresoras de tumores que previenen la proliferación o supervivencia de las células con riesgo de desarrollar inestabilidad genómica. El estrés oxidativo incrementa la velocidad de pérdida de telómeros, y reduce la vida media de las células [23], [156]–[158].

En 1990, de forma independiente, de Lange y el grupo de Hastie observaron que los telómeros de las células tumorales humanas eran más cortos que los de las células normales circundantes. Estudios posteriores trataron de justificar este hallazgo y se formuló la hipótesis de la telomerasa y la inmortalización celular, en la cual se distinguen dos etapas:

1. Fase de mortalidad M1. En ella, las células somáticas normales pierden longitud telomérica con cada división celular y al alcanzar el límite de Hayflick entran en un estado de senescencia celular. Esta fase tiene lugar cuando los telómeros se acortan lo suficiente como para que los extremos distales de los cromosomas dejen de estar totalmente enmascarados y sean reconocidos como roturas de la doble cadena que necesitan ser reparadas. La senescencia de las células en cultivo puede superarse mediante la inactivación de p53 y pRb, lo que capacita a las células para extender su capacidad replicativa hasta que entran en la segunda fase.
2. Fase de mortalidad M2: Crisis. La fase de crisis se caracteriza por muerte celular masiva, alteraciones cariotípicas asociadas a fusiones cromosómicas, apoptosis, y a la aparición

ocasional de una célula que ha adquirido un potencial replicativo indefinido (inmortalidad) [159].

La expresión de hTERT produce únicamente inmortalización; para que se produzca la transformación celular es necesario que vaya acompañada por la inactivación de los genes supresores de tumores y la activación de oncogenes [160]. Existen muchos factores implicados en la regulación de la expresión hTERT, entre ellos C-myc, NF- κ B, factores de crecimiento y algunas citoquinas [155].

El acortamiento de los telómeros puede inhibir ciertas etapas iniciales del crecimiento tumoral; sin embargo, este acortamiento puede facilitar el proceso neoplásico ya que favorece la selección de células malignas y promueve la acumulación de cambios genéticos posteriores [148], [160]. La regulación negativa de hTERT aumenta la apoptosis dependiente de Bcl-2, mientras que la sobreexpresión de hTERT bloquea este mecanismo de apoptosis por una vía independiente de p53 [161].

En la actualidad hay diversos estudios clínicos en marcha con agentes que actúan sobre la telomerasa, entre ellos, los inhibidores moleculares, los oligonucleótidos antisentido, las inmunoterapias, las terapias génicas y los tratamientos víricos [154], [162].

La terapia génica "suicida" utiliza a los promotores de genes de la telomerasa para introducir selectivamente en el tumor dosis elevadas de un agente citotóxico. Este tipo de terapia incluye: la terapia génica pro-apoptótica, la GDEPT (terapia con profármacos enzimáticos dirigida por genes) y la inmunoterapia. La terapia viral coloca genes virales críticos para la replicación bajo el control del promotor del gen hTERT, de modo que obtenemos vectores de virus que son capaces de replicarse sólo en las células cancerosas, liberando nuevos virus que infectarán a las células tumorales adyacentes e inducirán su muerte por lisis celular [154].

En la figura observamos tres de estas terapias antitumorales:

- A) Terapia dirigida por los genes promotores de la telomerasa, que pueden ser utilizados como diana terapéutica, debido a la expresión específica de la telomerasa por las células tumorales. Es una terapia versátil que permite la unión de los genes promotores a diversos genes terapéuticos, causando la muerte de las células tumorales.
- B) GDEPT (terapia con profármacos enzimáticos dirigida por genes). Consiste en la transferencia de un gen terapéutico que codifica una enzima activadora del profármaco en las células tumorales. Cuando se administra el profármaco, la expresión del gen terapéutico lo convierte en un agente citotóxico para las células tumorales, produciendo su muerte y propagándose a las células tumorales adyacentes.
- C) Terapia con virus oncolíticos: Mediante el uso de adenovirus modificados que inducirán la lisis de las células tumorales, como hemos comentado anteriormente.

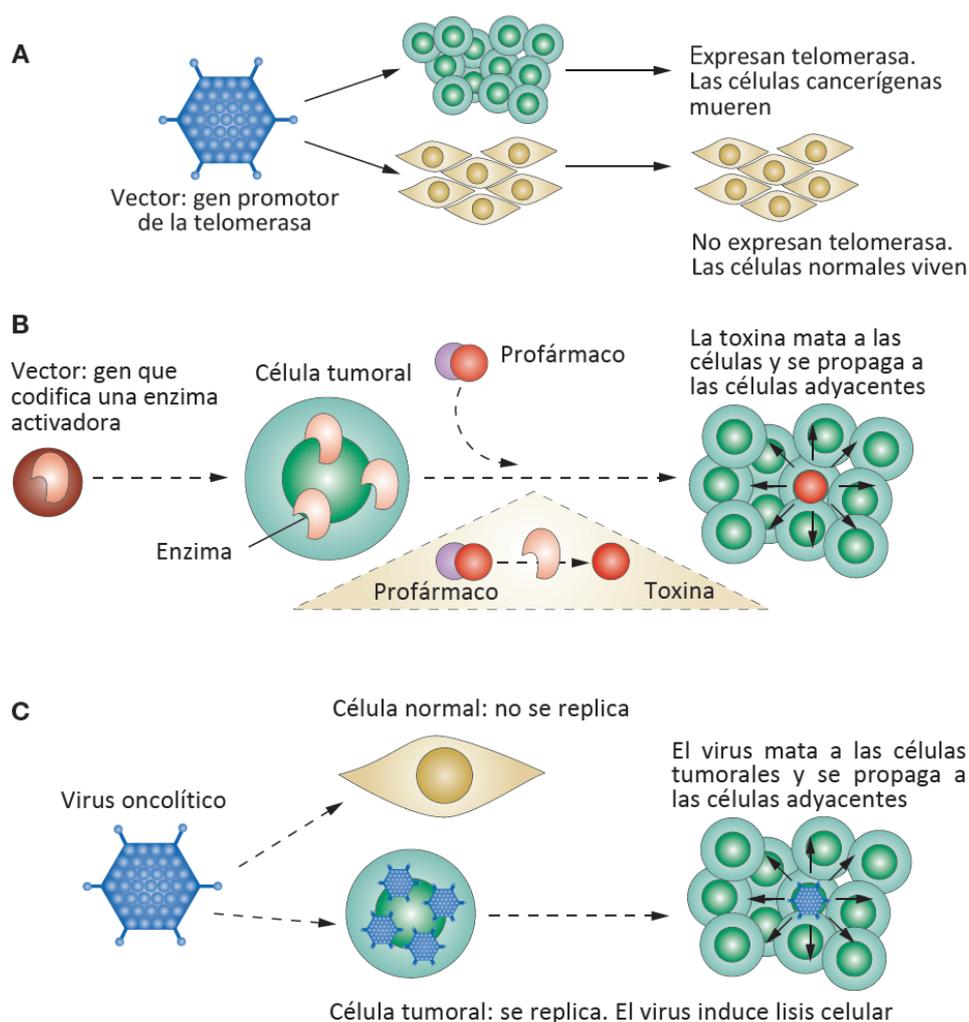


Figura I.46 Terapias antitumorales que implican a la telomerasa
Adaptado de Keith, W. N. et al. (2004) *Drug Insight: cancer cell immortality*
—telomerase as a target for novel cancer gene therapies [154]

I.3.7 Estrés oxidativo, estrés nitrosativo y progresión tumoral

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se producen continuamente en las células y desempeñan importantes funciones fisiológicas. Estos incluyen procesos tan diversos como la expresión génica, la proliferación celular y la supervivencia, la eliminación de patógenos por el sistema inmunológico, y la permeabilidad de los vasos sanguíneos [163]. La presencia de especies reactivas activa diversos factores de transcripción como NF- κ B, AP1 o NrF2, contribuyendo así a la regulación de la expresión genética. La modificación oxidativa de las proteínas por ROS también produce alteraciones en las actividades enzimáticas, la transmisión de señales o la regulación metabólica [127], [141], [164].

Cuando la cantidad de ROS/RNS excede la capacidad de la maquinaria antioxidante se produce el estrés oxidativo/nitrosativo. El estrés oxidativo (EO) es el resultado de la producción excesiva de

especies reactivas de oxígeno, que superan la capacidad defensiva de los sistemas antioxidantes. Las ROS atacan mediante secuestro electrónico a las macromoléculas orgánicas (fosfolípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos) [23]. Por su parte, el estrés nitrosativo (EN) es el resultado de una sobreproducción de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El estrés nitrosativo puede llevar a reacciones de nitrosilación que pueden alterar la estructura de las proteínas e inhibir su funcionamiento normal [132]. La formación de nitrotirosina, un marcador de estrés nitrosativo, ha sido documentada en pacientes con Alzheimer y Parkinson [165].

El EO y EN representan un mecanismo que subyace en la evolución y patogenia de múltiples enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas, las alteraciones cardiovasculares y las neoplasias. La expectativa de vida máxima de las especies animales viene en gran parte determinada por el aumento en la incidencia de estas enfermedades [127].

El NO y algunos de sus metabolitos (como nitritos, nitratos, S-nitrosotioles, nitrosaminas y especies mixtas como los peroxinitritos) tienen un papel importante en la mediación de muchos de los efectos citotóxicos y genotóxicos del NO, tales como la inhibición de la respiración mitocondrial y daños en el ADN y las proteínas que pueden resultar en mutaciones genéticas, pérdida de función de las proteínas, necrosis y apoptosis [166].

La inflamación crónica y la exposición continua a concentraciones moderado-elevadas de NO producido por iNOS pueden promover la transformación neoplásica. Algunos estudios han mostrado que la inducción de iNOS en células tumorales promueve la angiogénesis. El NO y las RNS inducen estrés oxidativo y nitrosativo, lo que resulta en daños en el ADN (tales como desaminación nitrosativa de bases de ácidos nucleicos, alquilación y roturas en la cadena de ADN) y la inhibición de las enzimas de reparación del ADN (como alquiltransferasas y ADN ligasas) a través de mecanismos directos e indirectos. Las mutaciones en el gen p53 o la S-nitrosilación de las caspasas, pueden producir células resistentes a la apoptosis y facilitar aún más la acumulación de mutaciones [166]. Por otra parte, algunos estudios parecen indicar que el NO puede tener un papel inhibitorio en la tumorigénesis [167], lo cual indica una gran complejidad en el papel del NO en el proceso tumoral, probablemente dependiente del tipo de tumor, del microambiente del tejido y de la concentración de especies reactivas presentes [163].

Otro proceso relevante es el envejecimiento, el cual puede definirse como la disminución progresiva de la capacidad de un organismo para resistir el estrés, el daño y las enfermedades [168]. Se han desarrollado diversas teorías tratando de explicar los mecanismos que conducen al envejecimiento, entre las que cabe destacar la "Teoría de los radicales libres y el envejecimiento" propuesta por Harman (1956) que señala el daño tisular y la muerte celular producidos por el ataque de los radicales libres como causas del envejecimiento, y muestra que el aumento de las defensas antioxidantes puede alargar la vida de un organismo [169].

Los estudios realizados parecen señalar que a medida que una especie envejece, su capacidad de respuesta antioxidante se ve alterada, lo que contribuye a un mayor grado de lesiones moleculares y

orgánicas por EO. La pérdida paulatina de enzimas y cofactores antioxidantes juega un papel importante en el deterioro orgánico progresivo [23].

I.3.7.1 Daños moleculares inducidos por ROS/RNS

Podemos distinguir tres principales grupos de compuestos celulares que pueden ser dianas de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. También podemos destacar en menor medida, el daño a glúcidos.

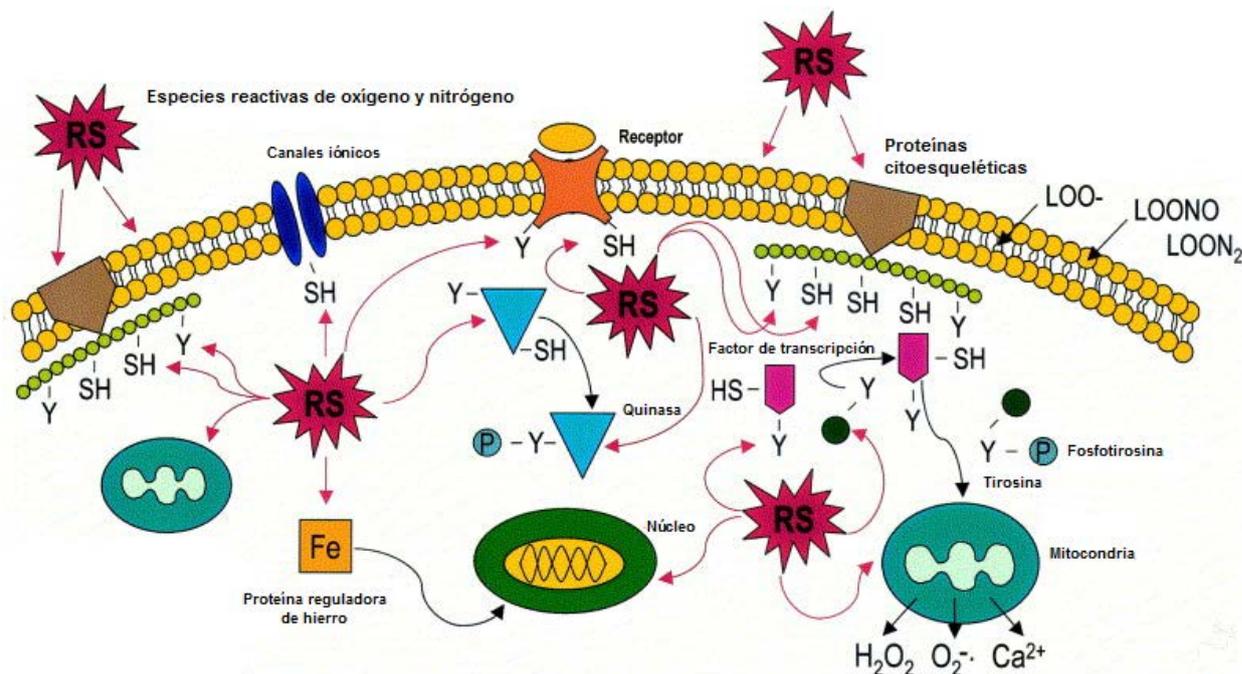


Figura I.47 Dianas moleculares de las ROS/RNS

Adaptado de Mruk D. et al. (2002) *Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility* [170]

I.3.7.1.a Lípidos

Los lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres [126]. Este proceso de ataque oxidativo se denomina peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica produce daño celular por la modificación de las propiedades físico-químicas de la membrana, lo que altera su permeabilidad y el control de la homeostasis celular. Además se produce la oxidación de los grupos sulfhidrilo ($-SH$) de las proteínas implicadas en el transporte iónico y en la inhibición de la síntesis de ATP. Se postula que el estrés oxidativo podría incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ y activar diversas fosfolipasas y proteasas, lo que conduciría a fenómenos de necrosis o de apoptosis celular [171].

Los mecanismos radicalarios constan de tres fases: inicio, propagación y terminación. El proceso se inicia cuando una especie reactiva de oxígeno capta un átomo de hidrógeno de un carbono contiguo a

un doble enlace, con la consiguiente formación de un radical lipídico alquil. En este primer paso se consigue una desorganización y destrucción de las membranas citoplásmicas con una pérdida de función y liberación de los contenidos orgánicos.

Durante la propagación, el radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno molecular, dando lugar a un radical lipídico peroxil. Este nuevo radical reacciona a su vez con otro lípido, produciéndose una reacción en cadena donde el número de especies reactivas irá aumentando. En este proceso los lípidos pueden sufrir fragmentación, generándose un gran número de productos.

Los radicales formados pueden oxidar una gran cantidad de sustancias, sobre todo hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano y aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) [126], [140]. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, provocando mutaciones en el ADN y daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas [172].

La reacción sólo se detendrá cuando dos especies radicalarias reaccionen dando lugar a una especie no radicalaria. Para ello, la concentración de especies radicalarias deberá ser lo suficientemente elevada para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Para acelerar esta fase de terminación los organismos han evolucionado introduciendo antioxidantes de carácter eliminador, conocidos como *scavengers* o neutralizadores (captadores fisiológicos de radicales libres). Algunos de ellos son la vitamina E o las enzimas SOD, catalasa o peroxidasa.

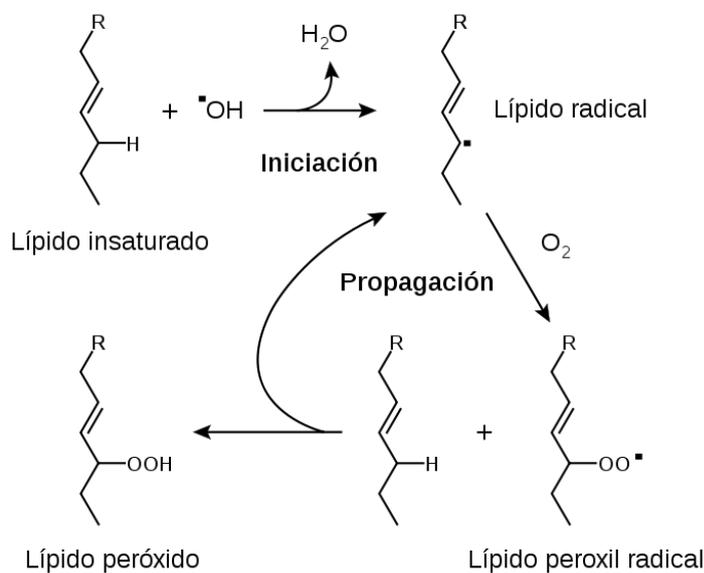


Figura 1.48 Mecanismo de peroxidación lipídica

Como ya hemos mencionado anteriormente, la cuantificación del estrés oxidativo resulta de gran relevancia para la comprensión de numerosos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos, por lo que la búsqueda de marcadores fiables de este proceso es de gran interés.

Las técnicas tradicionales para el estudio de la peroxidación lipídica han sido entre otras: a) visualización de lipofucsina en los depósitos tisulares, especialmente en corazón y cerebro; b) espectrofotometría de dienos conjugados en extractos lipídicos de plasma; c) cromatografía de gases de etano, pentano, y otros alcanos exhalados en el aliento; d) la hidrólisis de lipoperóxidos en plasma para formar malondialdehído (MDA) que reacciona con ácido tiobarbitúrico (TBA) para producir un aducto MDA-TBA que se mide por espectrofotometría o fluorimetría, por lo general después de la extracción en butanol [173].

Los marcadores de peroxidación lipídica más representativos hoy en día son: Malondialdehído (MDA) e Isoprostanos.

- Malondialdehído (MDA): El malondialdehido es uno de los productos del proceso de peroxidación lipídica y un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular. Wong y colaboradores propusieron un método para determinar el MDA por análisis del aducto MDA-TBA₂ mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), método mucho más específico y sensible que los anteriores [173].
- Isoprostanos: Los isoprostanos son una familia de eicosanoides que se producen mediante un mecanismo no enzimático de peroxidación del ácido araquidónico inducido por radicales libres. Fueron descritos por Morrow y colaboradores en 1990 [174]. Debido a su semejanza estructural con las prostaglandinas (PG) desde un primer momento se sospechó que pudieran tener actividad biológica específica. Al ser los isoprostanos productos secundarios de la peroxidación lipídica, cuantificables y de gran estabilidad química, se ha llevado a cabo su medición en diversos fluidos corporales, siendo la orina el más recomendado. Además, la cuantificación de los isoprostanos ha sido propuesta como marcador pronóstico en determinadas patologías inflamatorias y degenerativas, como el fallo cardíaco, y como una herramienta para la evaluación de la terapia antioxidante [171], [175].

I.3.7.1.b Proteínas

El daño oxidativo a proteínas se puede producir a través de distintos procesos, como por ejemplo la formación de grupos carbonilo, reacciones con aldehídos, nitración de residuos de aminoácidos aromáticos, oxidación de grupos sulfidrilo, entrecruzamientos proteína-proteína o proteína-ADN o fragmentaciones de la cadena peptídica [176], [177].

Cualquier aminoácido tiene residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo, siendo los más propensos a sufrir procesos oxidantes: la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína [178]. Su oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, la pérdida o modificación de su función biológica. El

daño oxidante suele ser irreversible, salvo en el caso de la metionina y la cisteína [179], y puede conducir a la desnaturalización de la proteína. En las enzimas puede impedir su actividad catalizadora [180].

El marcador más general y más utilizado de la oxidación de proteínas es el contenido de proteínas carboniladas. La oxidación catalizada por un metal (OCM) es uno de los mecanismos por los cuales se introducen grupos carbonilo en las proteínas y se produce por reacción del H_2O_2 con un metal como Fe^{2+} o Cu^{2+} , en la que se genera el radical $\cdot OH$. Éste, a su vez, reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión a metal de la proteína, transformándolas en carbonilos. El método de cuantificación más habitual es la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y los grupos carbonilo, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, que se cuantifica mediante espectrofotometría [181].

I.3.7.1.c Glúcidos

Los glúcidos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas.

El daño oxidativo a los glúcidos cobra importancia en el caso de los polisacáridos, cuya función es estructural, ya que ocasiona su despolimerización y da lugar a procesos degenerativos. Por ejemplo, en la artritis reumatoide se produce la fragmentación por oxidación del ácido hialurónico, conduciendo a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial [180].

I.3.7.1.d Ácidos nucleicos

El papel que juega la oxidación del ADN en la carcinogénesis experimental y humana continúa siendo objeto de estudio. La evidencia experimental que prevalece en la actualidad apunta hacia las alteraciones genéticas y epigenéticas como responsables de la transformación maligna de las células.

En el caso de las alteraciones genéticas, podemos destacar las modificaciones oxidativas que se producen en el ADN; particularmente la oxidación de la guanina en su carbono 8, produciendo 8-oxo-7,8'-2-deoxiguanosina, cuyo potencial mutagénico hace de esta base modificada un factor etiológico importante. Kuchino, Nishimura y el grupo de Grollman fueron pioneros en el estudio de la relación entre el estrés oxidativo y el proceso tumoral a través de la oxidación del material genético; demostraron que la oxidación de la guanina a 8-oxo-dG inducía errores en la replicación del ADN por parte de la polimerasa dependiente de ADN [23], [182].

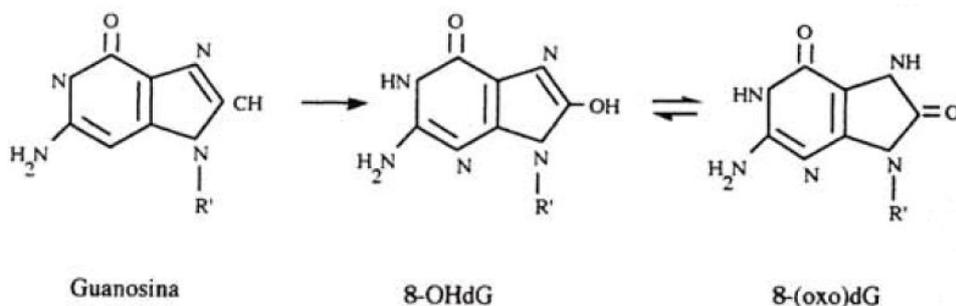


Figura I.49 Oxidación de la Guanosina

Oliva, R. et al. (1997) *Radicales libres y modificación oxidativa del DNA. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana* [182]

Estudios posteriores señalaron que la ADN polimerasa incorpora selectivamente citosinas (C) y adeninas (A) opuestas a una 8-oxoguanina de acuerdo con las propiedades de complementariedad de ésta. Los cambios conformacionales inducidos por la guanina oxidada parecen ser los responsables del apareamiento de bases nucleotídicas no complementarias, al permitir el establecimiento de puentes de hidrógeno con adenina (A) y timina (T).

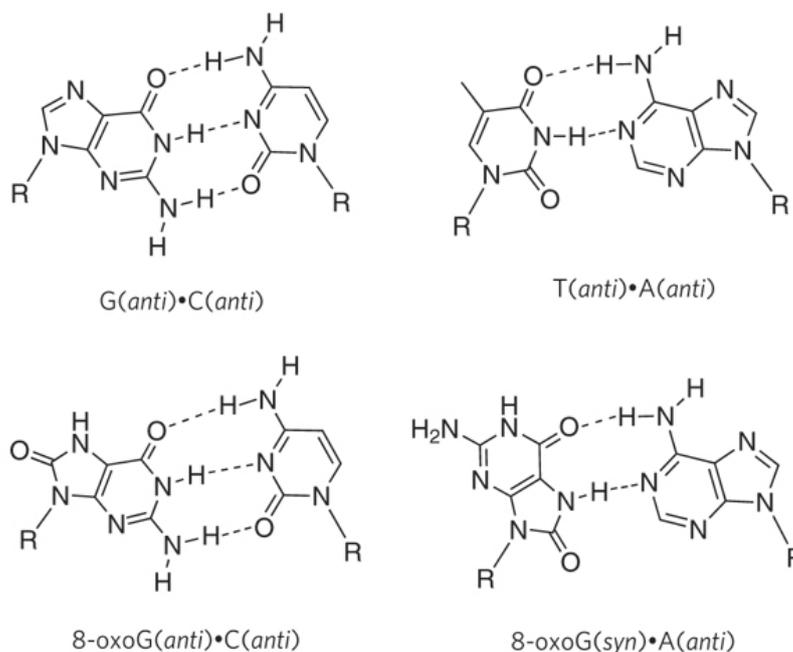


Figura I.50 Comparación de las estructuras de los pares de bases G-C y T-A con 8-oxoG-C y 8-oxoG-A
David, S.S. et al (2007) *Base-excision repair of oxidative DNA damage* [183]

Posiblemente, la transición mutacional G-C a A-T sea la lesión más frecuente en términos oxidativos. Estos errores, que persisten a pesar de los mecanismos de reparación, se producen tanto de forma espontánea como inducidos por agentes oxidantes.

Existen múltiples sistemas enzimáticos encargados de la reparación de lesiones en el material genético y algunas de estos actúan específicamente sobre la 8-oxo-dG. Uno de ellos es la glicosilasa

hOGG1, que actúa sobre el ADN mitocondrial y nuclear, reparándolo y eliminando 8-oxoguanina. La 8-oxoguanina y la 8-oxo-dG se difunden al espacio extracelular y son puestas en circulación por el plasma sanguíneo, concentrándose finalmente en la orina. El papel de la hOGG1 en la prevención de la carcinogénesis inducida por ROS es de suma importancia y su inactivación puede incrementar la aparición temprana de transformaciones malignas celulares [184].

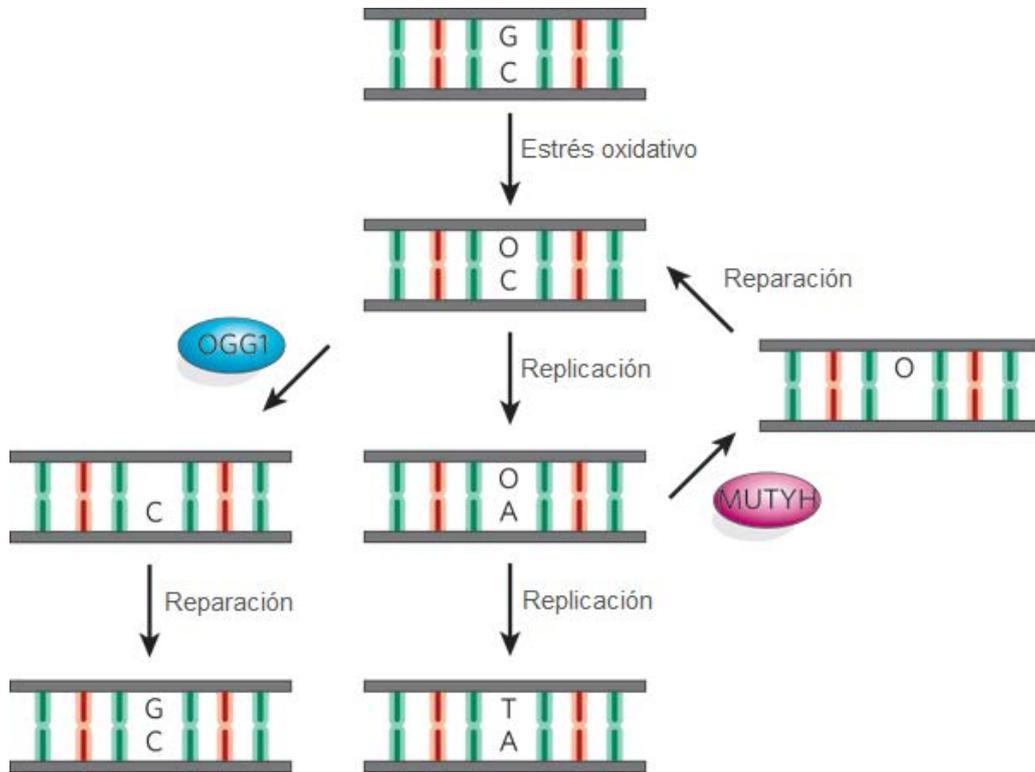


Figura 1.51 Reparación del ADN

Adaptado de David, S.S. et al (2007) *Base-excision repair of oxidative DNA damage* [183]

El acumulo progresivo de oxidaciones en el ADN, con el paso del tiempo, podría explicar, no sólo su inestabilidad genética, sino también la pérdida funcional de múltiples proteínas y el deterioro de la homeostasis celular.

En cuanto a las alteraciones epigenéticas, el EO afecta de forma significativa a la actividad de los procesos de modificación metabólica del ADN y su expresión génica. También afecta a p53, que responde a estímulos diferentes que inciden sobre el material genético y además experimenta cambios conformacionales y de expresión dependiendo del estado redox del medio. La presencia de estrés oxidativo o una menor disponibilidad de antioxidantes bloquea el paso de la fase G1 a S. En este punto intervienen las sirtuinas y el factor transcripcional FOXO, que aumentan la resistencia al estrés oxidativo. El aumento de la expresión de FOXO se traduce en un aumento, a su vez, de los niveles de agentes citostáticos y apoptóticos. Todo parece indicar que la teoría de los radicales libres es el punto común donde coinciden los mecanismos de proliferación y apoptosis, de senescencia y envejecimiento [23].

Dado el papel crucial del p53 en la prevención de tumores, la disminución de su actividad con el paso de los años podría contribuir al aumento de la frecuencia de cáncer a edades avanzadas, y

proporciona una explicación plausible a la correlación entre la tumorigénesis y el envejecimiento, además de la acumulación de mutaciones en el ADN a lo largo de la vida [168].

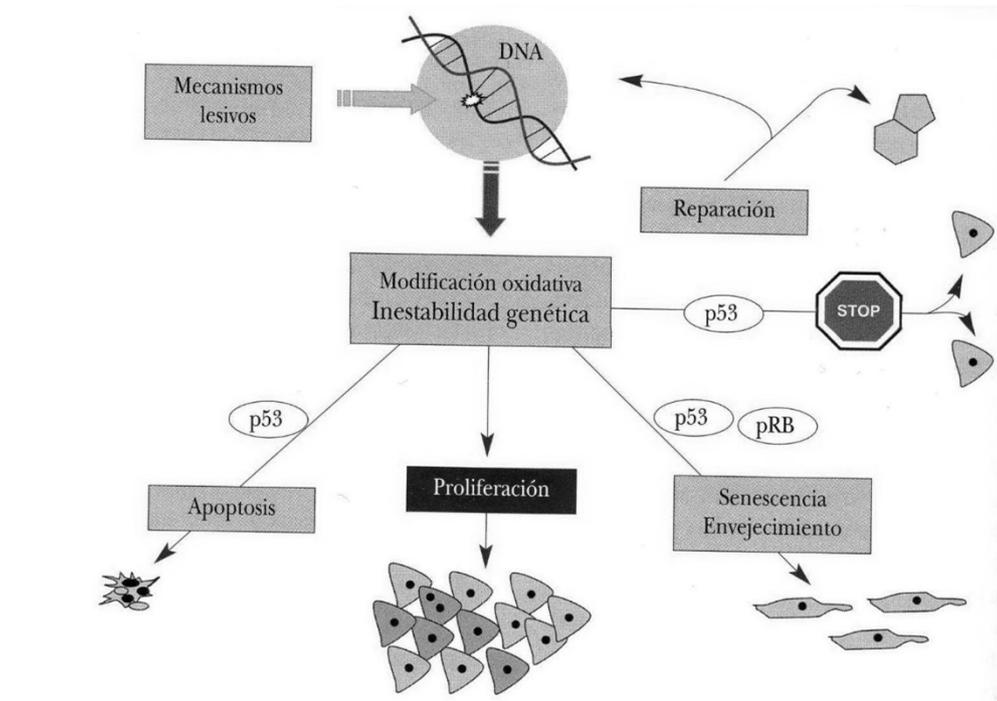


Figura I.52 Inestabilidad del ADN y papel regulador de la proteína p53 en la protección del material genómico
Cerdá et al. (2009) *Estrés oxidativo, envejecimiento y cáncer* [23]

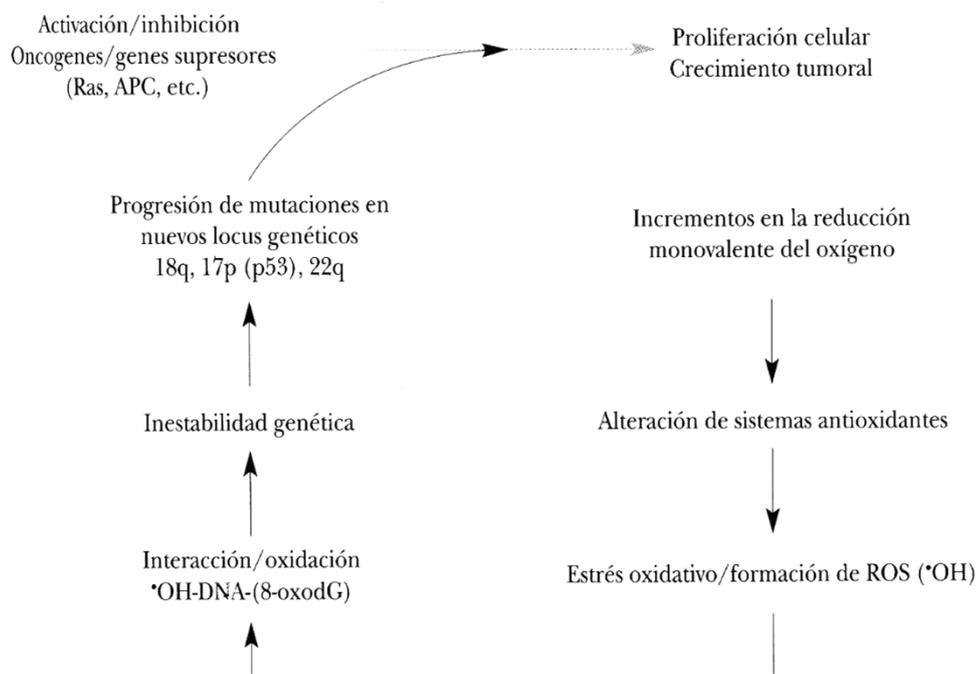


Figura I.53 Implicación del EO en la progresión de lesiones genéticas.
Cerdá et al. (2009) *Estrés oxidativo, envejecimiento y cáncer* [23], [185]

La radiación de alta energía interviene en las tres etapas del proceso tumoral: la iniciación, promoción, activación de protooncogenes y/o inhibición de genes supresores. Podemos distinguir dos vías de acción: la acción directa de la radiación sobre el ADN y la formación de radicales $\cdot\text{OH}$. La interacción de los radicales $\cdot\text{OH}$ con el ADN da lugar a diversos tipos de modificaciones nucleotídicas.

Las especies reactivas y concretamente las ROS son en gran parte responsables de la diferenciación y senescencia de las células. En este proceso irreversible intervienen diversos mecanismos, tales como el acortamiento de los telómeros, los cambios epigenéticos en locus como INK4a/ARF y el daño del material genético [23].

1.4 Efecto antitumoral de los polifenoles

1.4.1 Polifenoles naturales

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, con una función defensiva frente al ataque de plagas y otros factores de estrés [186]. Forman parte de nuestra dieta a través de la ingesta de fruta y hortalizas, y derivados (zumos, vino y té) y contribuyen de forma decisiva al sabor, aroma y color de los mismos, determinando así su calidad [187].

Las polifenoles constituyen un numeroso grupo de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados [147].

Se han descrito numerosas propiedades asociadas a estos compuestos, entre las que destacan: antioxidantes [188]–[190], cicatrizantes [191], antimicrobianas y antifúngicas [192], [193], antiinflamatorias y analgésicas [194]–[196], además de tener efectos beneficiosos en el cáncer, enfermedades neurodegenerativas [197], [198], enfermedades cardiovasculares [199], síndrome metabólico [200], [201] y diabetes [202].

El grupo de polifenoles más abundante corresponde a los flavonoides. Se divide en 13 clases y comprende más de 5000 sustancias [188], entre las que destacan los antocianos (responsables del color rojo o púrpura de la uva tinta, la ciruela y la fresa), los flavanoles o derivados de la catequina (presentes en uva, cereza y, sobre todo, té y vino), los flavonoles (presentes en la mayoría de las frutas y muy abundantes en la cebolla), las flavanonas (en cítricos), las flavonas (en perejil, apio y pimiento) y las isoflavonas (sobre todo en soja). Dentro de los polifenoles no-flavonoides encontramos los estilbenos (presentes por ejemplo en uva y vino), los ácidos hidroxicinámicos (abundantes en alcachofa, uva y brécol) y los derivados hidroxibenzoicos (por ejemplo, los derivados del ácido elágico y elagitaninos, en fresa, frambuesa, granada y nuez) [186].

Aunque se han postulado los numerosos efectos beneficiosos para la salud de los polifenoles en general, las observaciones que sustentan dichos postulados se basan principalmente en estudios *in vitro*. Sin embargo, existen relativamente pocos datos en relación con la actividad antiproliferativa *in vivo* y no

se ha concluido nada sobre la relevancia clínica de esta bioactividad. Todas las propiedades demostradas en los estudios *in vitro*, sólo serán realmente efectivas *in vivo* si alcanzan los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Además, la biodisponibilidad de los polifenoles naturales de los alimentos es muy variable, dependiendo del tipo de molécula, y la mayoría de ellos son metabolizados por los microorganismos del colon y por las células epiteliales intestinales antes de ser absorbidos hasta el torrente circulatorio. Por otra parte, el procesado de los alimentos también afecta a la biodisponibilidad y bioactividad de los mismos. Es por tanto esencial conocer la absorción y el metabolismo de estos polifenoles en el organismo humano mediante estudios de su biodisponibilidad *in vivo* [147], [203].

I.4.2 Clasificación y estructura química de polifenoles

Los polifenoles son compuestos orgánicos que se caracterizan por tener al menos dos o más grupos fenol. Inicialmente denominados taninos, fueron definidos en 1957 por T. White como “compuestos polifenólicos con masas moleculares entre 500-3000 Da y suficientes grupos fenólicos para formar enlaces covalentes cruzados entre las fibras de colágeno”. Esta última propiedad hace referencia a la capacidad curtiente de pieles, que ha sido utilizada desde la antigüedad para confeccionar prendas de ropa con cueros [204].

La definición más reciente usada hoy en día, es la que se conoce como la WBSSH o White-Bate-Smith-Swain-Haslam. Los polifenoles pueden definirse como “compuestos fenólicos que se encuentran en las plantas, solubles en agua, que tienen masas moleculares entre 500 y 4000 Da, que poseen de 12 a 16 grupos fenol y entre 5 y 7 anillos aromáticos por cada 1000 Da de masa molecular relativa y que además de las reacciones típicas de los fenoles, tienen la capacidad de precipitar con alcaloides, gelatina y otras proteínas” [205]. Bajo esta definición, los taninos quedan comprendidos en el grupo de los polifenoles, pero no todos los polifenoles son taninos.

De acuerdo con el número de átomos de carbono que presentan, podemos clasificar los compuestos fenólicos en distintas familias:

Tabla I-3 Principales familias de los compuestos fenólicos

Estructura	Familia
C_6	Fenoles simples
C_6-C_1	Ácidos fenólicos
C_6-C_2	Ácidos fenilacéticos y acetofenonas
C_6-C_3	Cumarinas y ácidos hidroxicinámicos
$(C_6-C_3)_2$	Ligninas
$(C_6-C_3)_n$	Lignanós
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos y antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables

De origen biogenético mixto, los polifenoles son metabolitos que provienen de la vía del ácido shíkímico y de la vía del acetato [204]. Normalmente forman conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a grupos hidroxilo, aunque también existen algunos que enlazan directamente el azúcar con un carbono del anillo aromático. Los azúcares asociados pueden ser monosacáridos, disacáridos o polisacáridos. La glucosa es el residuo de más común, aunque también pueden encontrarse residuos de galactosa, rhamnosa, xilosa y arabinosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico entre otros. También es habitual encontrar asociaciones con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas y lípidos u otros fenoles [188].

Los flavonoides es una de las familias de compuestos fenólicos más importante. Presentan una estructura básica de fenil-benzo- γ -pirona $C_6-C_3-C_6$ caracterizada por un esqueleto de dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado. Las variaciones estructurales en el anillo C, subdividen a los flavonoides en seis importantes subclases; entre los que se encuentran las flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianidinas y flavan-3-ol (también llamados flavanoles). Los compuestos individuales dentro de cada grupo se distinguen por la sustitución en los anillos A y B [137], [188].

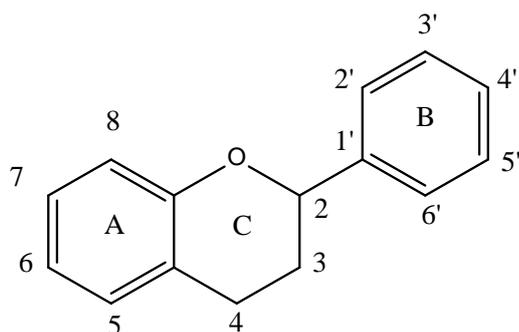


Figura I.54 Estructura de los flavonoides

También podemos destacar la familia de los estilbenoides. Considerados fitoalexinas (metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana que la planta sintetiza en respuesta a una infección microbiana) aunque no todos tienen actividad antifúngica. Con más de 1000 compuestos encontrados, se dividen en 6 clases: estilbenos, bibencilos, bisbibencilos, fenantrenoides, oligómeros de estilbeno y otros estilbenoides [206].

La estructura básica de los estilbenos está formada por dos anillos aromáticos unidos por un puente metileno. El anillo A normalmente lleva dos grupos hidroxilo en posición meta, mientras que el anillo B puede ser sustituido por grupos hidroxilo y metoxilo en distintas posiciones. Puesto que el doble enlace no permite rotación libre, sólo se encuentran en dos posibles configuraciones: cis o trans. La forma trans es la más habitual. Los estilbenos son el grupo de estilbenoides más investigado por sus propiedades, especialmente el resveratrol y sus análogos. Los estilbenos se dividen en cinco grupos, de los cuales destacamos el primero (estilbenos simples) al que pertenecen el resveratrol y sus análogos [206].

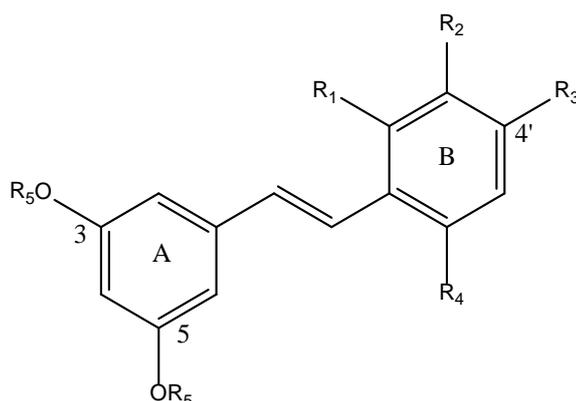
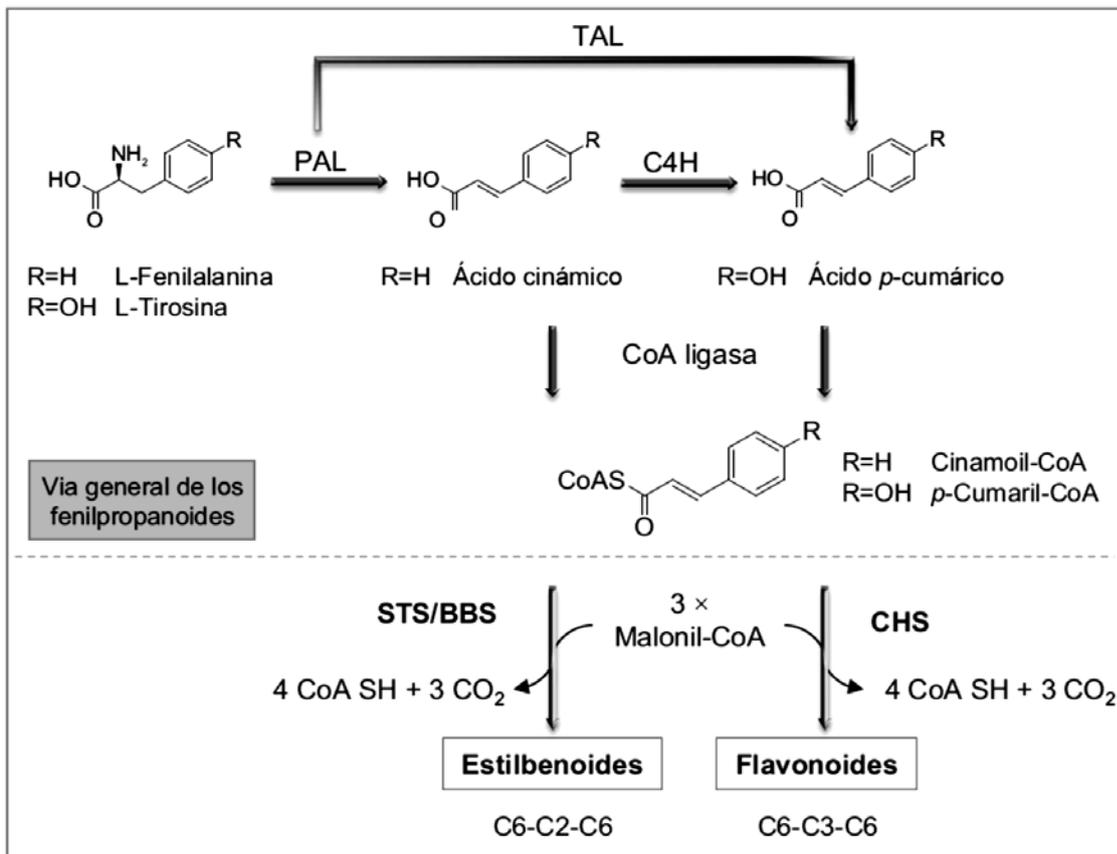


Figura I.55 Estructura de los estilbenos simples

La biosíntesis de los estilbenos requiere específicamente de la presencia de la estilbeno sintasa y de las moléculas precursoras para la formación de hidroxi-estilbenos son malonil-coenzima A (CoA) y p-cumaril-CoA, ambas presentes en las plantas [207].



PAL: fenilalanina amonio liasa; TAL: tirosina amonio liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; STS: estilbeno sintasa; BBS: bibencilo sintasa; CHS: calcona sintasa.

Figura 1.56 Vía del fenilpropanoide para la formación de estilbenoides y de flavonoides. Adaptado de Alfaras, I. (2011) "Estudi de la biodisponibilitat del trans-resveratrol i el seu efecte quimiopreventiu del càncer de còlon induït per 1,2-dimetilhidrazina en rata" [208]

Los estilbenoides se sintetizan por la vía del fenilpropanoide a partir de la fenilalanina, compartiendo la primera parte de esta ruta con los flavonoides. La fenilalanina se transforma en ácido cinámico mediante la fenilalanina amonio liasa (PAL). El ácido cinámico se convierte en ácido p-cumárico (o ácido 4-cumárico) mediante la cinamato 4-hidroxilasa (C4H). En algunas especies, la PAL también tiene actividad tirosina amonio liasa (TAL), convirtiendo directamente la tirosina en ácido p-cumárico. En el paso siguiente, el ácido p-cumárico es transformado en 4-cumaril-CoA mediante la 4-cumarato CoA ligasa (4CL). El 4-cumaril-CoA es el punto central de la ruta fenilpropanoide. La formación de estilbenoides a partir del 4-cumaril-CoA está controlada por las enzimas estilbeno sintasa y bibencilo sintasa, mientras que la de los flavonoides la realiza la calcona sintasa [208].

I.4.3 Biodisponibilidad de los polifenoles

La biodisponibilidad se define de diversas formas, pero es consecuencia de los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (generalmente acuñados bajo el acrónimo de LADME). La FDA (U.S. Food and Drug Administration) define la biodisponibilidad como: “la velocidad y extensión con la cual el principio activo es absorbido y se hace disponible en el sitio de acción” [209].

Los estudios publicados indican que la biodisponibilidad de los polifenoles presentes en la dieta varía mucho en cada individuo, pero en general, es demasiado baja para justificar efectos antioxidantes directos *in vivo*. No obstante, se ha señalado que otras formas conjugadas de estos polifenoles resultantes de las fases I y II del metabolismo, pueden tener una importancia fisiológica superior a la de la forma nativa, aunque los niveles de estas especies circulantes también suelen ser bajos. Se considera que esa baja biodisponibilidad se debe al metabolismo que sufren las agliconas y las formas conjugadas en el tracto intestinal [210].

La evaluación de la biodisponibilidad se realiza frecuentemente calculando la fracción relativa del fármaco no metabolizado excretada por la orina o de sus metabolitos si éstos representan adecuadamente al fármaco administrado [211].

La biodisponibilidad, desde el punto de vista de la nutrición, se expresa frecuentemente como la proporción de la dosis ingerida que es excretada en orina comparada con la excretada en heces [147]. El colon humano posee un ecosistema microbiano muy complejo; la microbiota intestinal tiene 10^{12} microorganismos por gramo de intestino y su composición es única para cada individuo y dependiente de las bacterias adquiridas de la madre durante el parto y la lactancia, el estado fisiológico del individuo, el entorno, la dieta y el estilo de vida [212].

El metabolismo o biotransformación de xenobióticos (en este caso los polifenoles), tiene lugar en dos lugares principalmente: el hígado y la pared de la mucosa intestinal. Las fases I y II transforman las sustancias en compuestos más solubles en agua y por tanto excretables. Las reacciones de la fase I (principalmente oxidaciones, reducciones e hidrólisis) están mediadas por enzimas del complejo citocromo P450 (CYP). Muchos polifenoles, debido a su polaridad, no suelen verse afectados por este tipo de transformaciones, y pasan directamente a la fase II, donde sufren reacciones de conjugación catalizadas por transferasas (principalmente metilaciones, glucuronidaciones y sulfataciones) [213], [214].

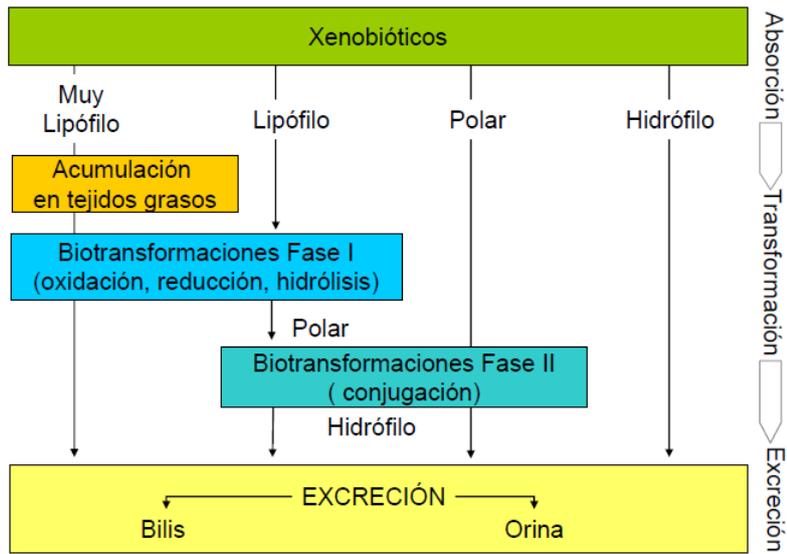


Figura I.57 Esquema de absorción, transformación y excreción de xenobióticos.

Touriño, S. (2009) "Contribución al establecimiento de las bases científicas para el uso de fracciones polifenólicas y fibra dietética antioxidante en la prevención del cáncer" [137]

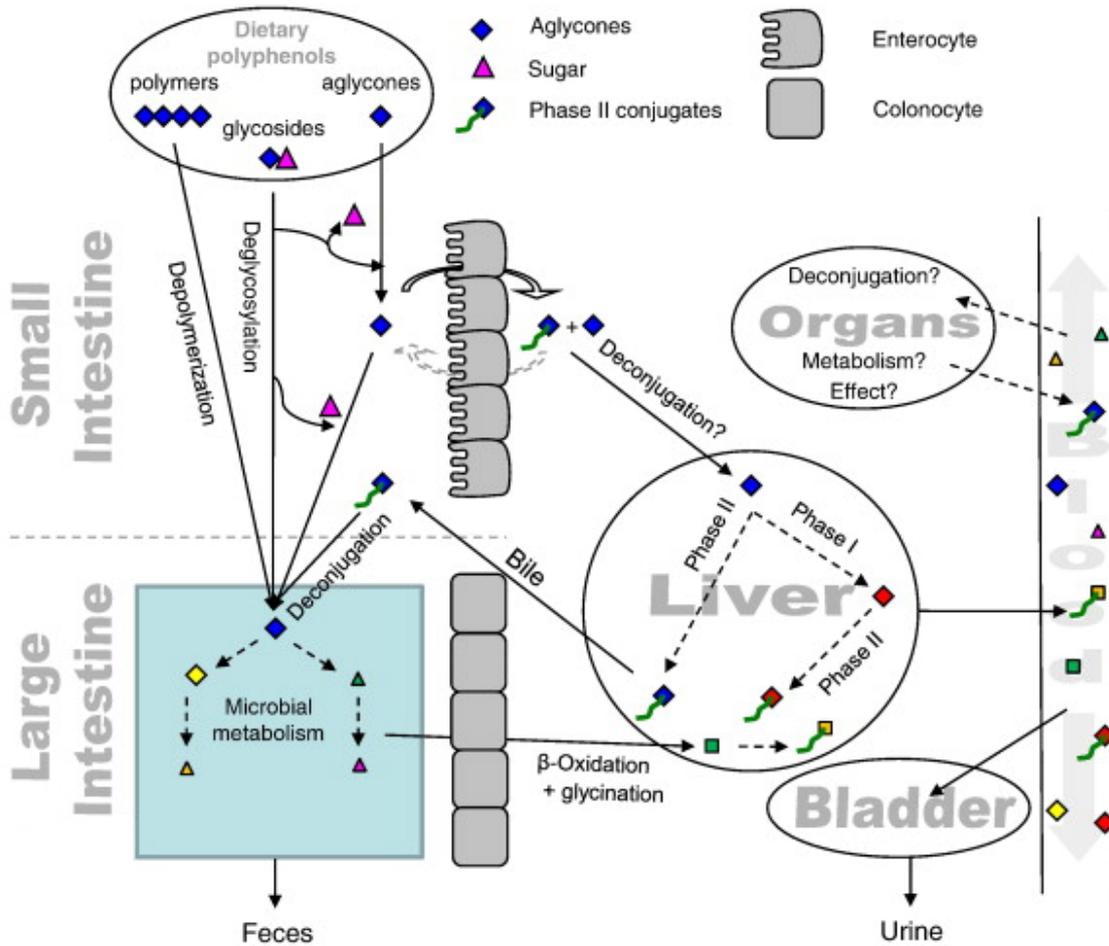


Figura I.58 Factores que influyen en la biodisponibilidad de los polifenoles

Possemiers, S. et al. (2011) *The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals* [210]

La absorción se define como el paso de un compuesto desde el sitio de administración, generalmente el tracto gastrointestinal, hasta el torrente sanguíneo. Para poder ser absorbidos, puesto que los flavonoides no son muy hidrosolubles y se encuentran presentes generalmente en alimentos en combinaciones con azúcares en forma de glicósidos, requieren la hidrólisis previa de la porción glicídica mediante β -glicosidasas bacterianas o humanas (desglicosilación) en agliconas [147], [212].

Las agliconas pueden ser conjugadas por las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) para formar glucurónidos y por sulfotransferasas (STs) para dar lugar a sulfatos. Éstos son mucho más fácilmente transportados en sangre (fase III) y excretados en bilis u orina que sus correspondientes agliconas [147]. Los glucurónidos son mucho menos activos biológicamente que sus agliconas de partida [203].

Los glucurónidos excretados en la bilis por los hepatocitos o en el lumen intestinal por los enterocitos pueden entrar en el proceso de recirculación enterohepática, donde los ácidos biliares son reabsorbidos a su paso por el tracto intestinal. Una pequeña fracción del reservorio de ácidos biliares no se reabsorbe en el intestino delgado y va al intestino grueso donde sufre una fermentación bacteriana y los glucurónidos pueden sufrir un proceso de desconjugación. De esta forma, pueden volver a adquirir su forma original y reentrar en la circulación [215]. La microbiota también puede catabolizar los polifenoles en moléculas más sencillas e incluso producir metabolitos con mayor actividad biológica [212]. Estas biotransformaciones pueden afectar a la biodisponibilidad y la actividad biológica de los polifenoles.

La biotransformación de los polifenoles es muy variable debido a tres factores: 1) La composición única de la microbiota de cada individuo conduce a diferencias en la bioconversión de los distintos polifenoles; 2) Existen pequeñas diferencias en los patrones de sustitución de los polifenoles que pueden repercutir en grandes diferencias en la biotransformación de los mismos; 3) La dieta afecta a la interacción polifenol-microbiota [212].

Como hemos visto, los compuestos liposolubles no se excretan directamente en orina sino que aparecen como metabolitos hidrosolubles. Parte de estas sustancias pueden almacenarse en los tejidos adiposos, de forma que la ingesta menos la excreción no reflejará la historia real del destino biológico de estos metabolitos [147]. Además, muchos compuestos sufren grandes modificaciones en el tracto gastrointestinal y su biotransformación depende de diversos factores exógenos y endógenos, alterando en gran medida su biodisponibilidad y bioactividad. Esto nos lleva a concluir que todavía queda mucho trabajo pendiente en la determinación de la biodisponibilidad y bioactividad de los compuestos fenólicos.

I.4.4 Polifenoles y efecto anticanceroso

Mencionamos específicamente los ejemplos que han sido motivo de los estudios correspondientes a la presente tesis.

I.4.4.1 Resveratrol

El trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina que se encuentra en una amplia variedad de plantas como uvas, moras, arándanos, cacahuetes y en el pino. Tiene un elevado poder antioxidante y ha demostrado tener efectos antiproliferativos y apoptóticos en una amplia variedad de tumores [207]. La actividad quimiopreventiva del resveratrol fue descrita por primera vez por el equipo de Jang [213].

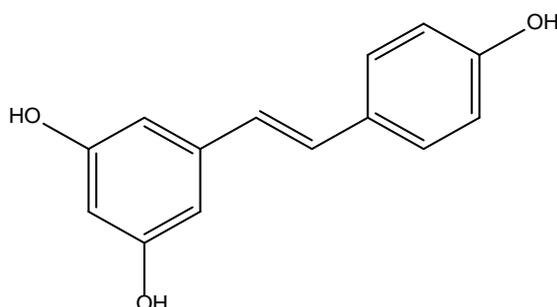


Figura I.59 Estructura del trans-resveratrol

Los mecanismos por los cuales el resveratrol ejerce un efecto antitumoral están bajo investigación activa. Se han propuesto, entre otros, los siguientes: la inhibición de las actividades ribonucleótido reductasa, ADN polimerasa, proteína quinasa C (PKC) o ciclooxigenasa-2 (COX-2); la inhibición de la proliferación celular y la carcinogénesis inducida por ROS; la activación de la muerte celular por apoptosis [216].

Su potencial anticancerígeno está fuertemente limitado por su baja biodisponibilidad [217]. Este hecho ha llevado a estudiar un gran número de análogos estructurales, naturales y sintéticos. Se ha estudiado la relación entre estructura y actividad del resveratrol, concluyendo que el grupo OH en posición 4' es más reactivo que los hidroxilos en posiciones 3' y 5', debido a efectos de resonancia, y determinante en la actividad antioxidante; y que la presencia de este grupo hidroxilo 4' junto con la conformación trans es imprescindible para la inhibición de la proliferación celular [218].

I.4.4.2 Pterostilbeno

El pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4-hidroxi-trans-estilbeno) es un análogo estructural del resveratrol que posee una capacidad antifúngica de 60 a 100 veces superior [216], [219]. Se encuentra en algunas variedades de uva y de arándanos y en el árbol de Narra y se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes y de enfermedades cardiovasculares [220]. Se han descrito sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas y hipolipidémicas.

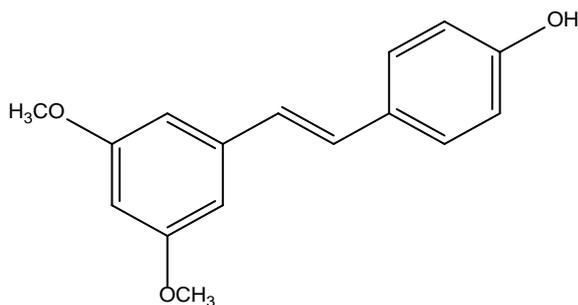


Figura I.60 Estructura del *trans*-pterostilbeno

Su vida media en el torrente sanguíneo es unas 5 veces superior a la del resveratrol y presenta una mayor actividad anticancerígena en experimentos *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a sus propiedades anticancerígenas, ha mostrado inhibir el crecimiento y la adhesión celular de algunos tipos de cáncer además de presentar actividad apoptótica [216], [221]. También ha sido identificado como un inhibidor de CYP1A1, una isoenzima del sistema citocromo P450 que se asume tiene un papel en la carcinogénesis, de lo cual se deduce que el pterostilbeno podría reducir el riesgo de mutagénesis y cáncer [222]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el pterostilbeno actúa como un potencial anticancerígeno todavía no están claros.

I.4.4.3 Quercetina

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) pertenece al grupo de los flavonoles y se encuentra presente en una amplia variedad de verduras (entre las que destaca la cebolla) y frutas, semillas, nueces, aceite de oliva, té, etc [223]. El tratamiento con quercetina se ha asociado con efectos antiproliferativos e inducción de muerte celular selectiva, principalmente a través de mecanismos proapoptóticos en líneas celulares cancerígenas pero no en líneas celulares normales [224].

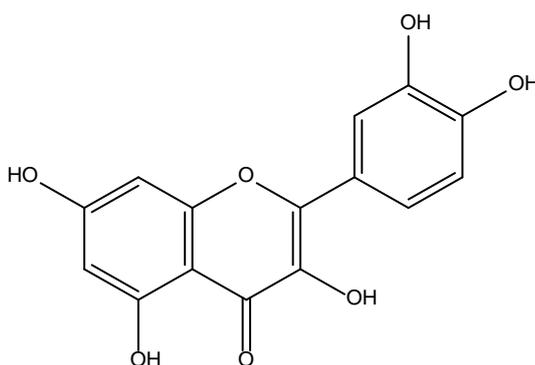


Figura I.61 Estructura de la quercetina

La quercetina es, además, un potente antioxidante. El equipo de Bors postuló tres criterios estructurales que definen una mayor capacidad antioxidante en los flavonoides: 1) presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto (catecol) en el anillo B, que le confiere mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; 2) un doble enlace entre el C2-C3 conjugado con la

función 4-oxo del anillo C que es responsable de la deslocalización de los electrones en el anillo B; 3) presencia de dos grupos hidroxilo en posición meta en C5 y C7 del anillo A. [137], [225], [226]

La quercetina cumple estas tres características estructurales por lo que presumiblemente será un antioxidante más potente que otros flavonoides.

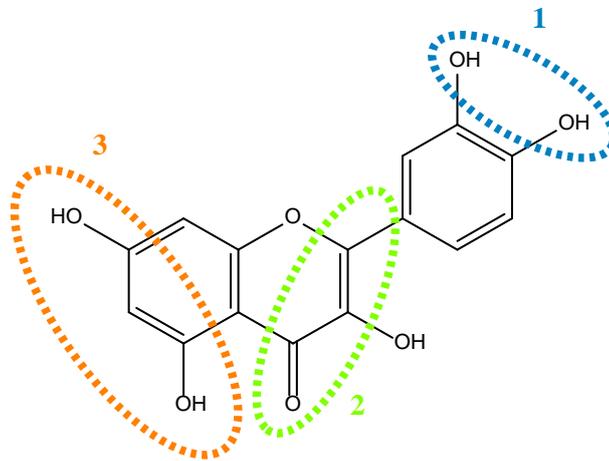


Figura 1.62 La quercetina cumple los tres criterios de Bors

Sus propiedades anticancerígenas podrían deberse a estimulación inmunológica, captura de radicales libres, alteración de la mitosis, inhibición de la expresión génica, disminución de la angiogénesis, inducción la apoptosis o una combinación de estos efectos [216].

1.5 Papel del GSH en la regulación del ciclo celular y apoptosis. Depleción de GSH y posibles aplicaciones en la terapia anticancerosa.

1.5.1 Glutación

El glutación o GSH (L-γ-glutamyl-cisteinil-glicina) es el tiol intracelular no proteico más abundante [227], tanto en eucariotas como procariotas [228] e interviene en la regulación de numerosas rutas celulares [229]. En condiciones fisiológicas normales, la mayor parte del GSH intracelular se encuentra en su forma reducida (0.5 a 10mM dependiendo del tipo celular) y tiene una distribución intracelular heterogénea, mientras que su concentración extracelular es relativamente baja (2 a 20 μM) debido a su rápido catabolismo [229]. El 85-90% del GSH se distribuye libremente en el citosol, pero también puede encontrarse en diversos orgánulos, incluyendo las mitocondrias, los peroxisomas, la matriz nuclear, y el retículo endoplasmático [230].

La oxidación del GSH para formar GSSG se produce por la interacción con radicales libres (debido a la presencia del enzima glutación reductasa, GR) o en mayor medida cuando el GSH actúa como cofactor para las GSH-peroxidasas, enzimas que se encargan de la detoxificación de los peróxidos generados en las membranas celulares [229]. El GSSG está formado por unión de dos moléculas de GSH mediante un

punto de enlace disulfuro entre las cisteínas [228]. En condiciones fisiológicas normales, la razón [GSH]:[GSSG], que es un indicador celular del estado redox, es 1:10 [231].

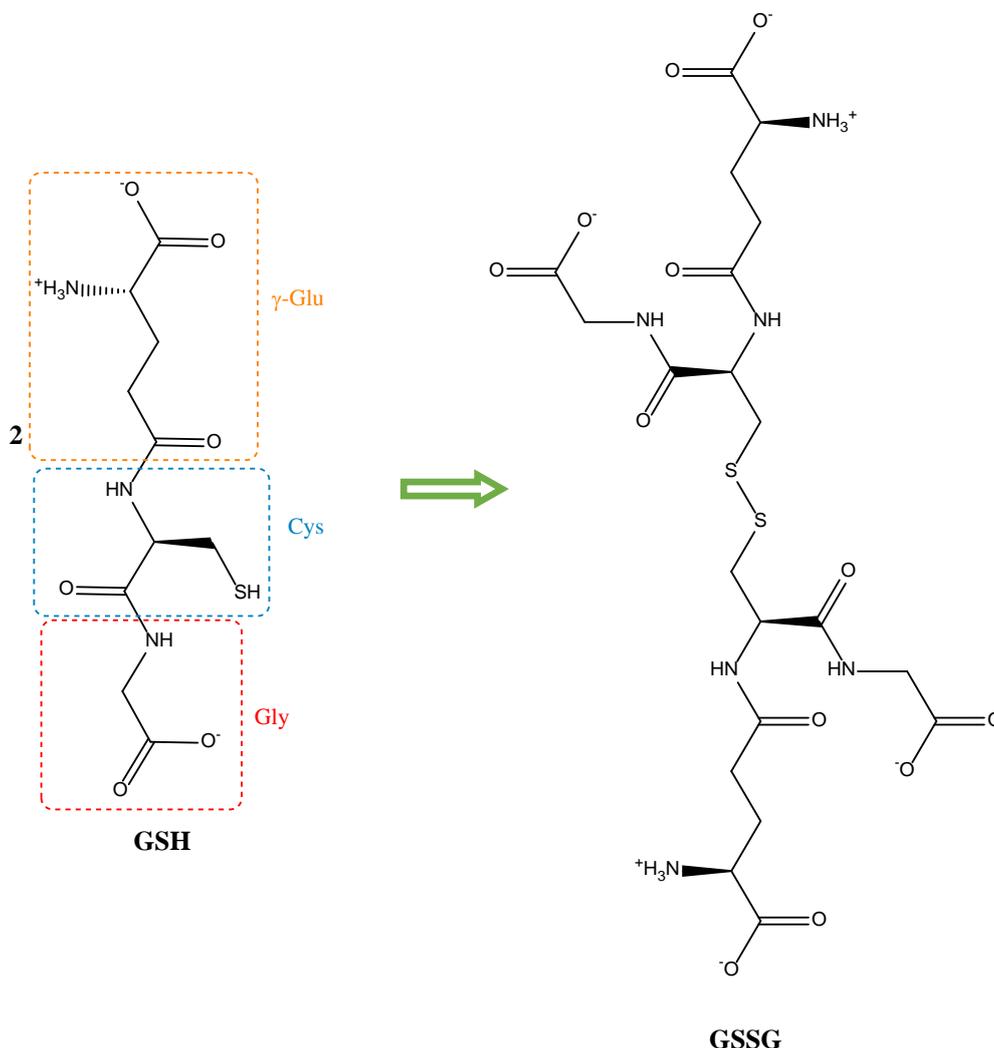


Figura I.63 Estructura del glutatión reducido y oxidado

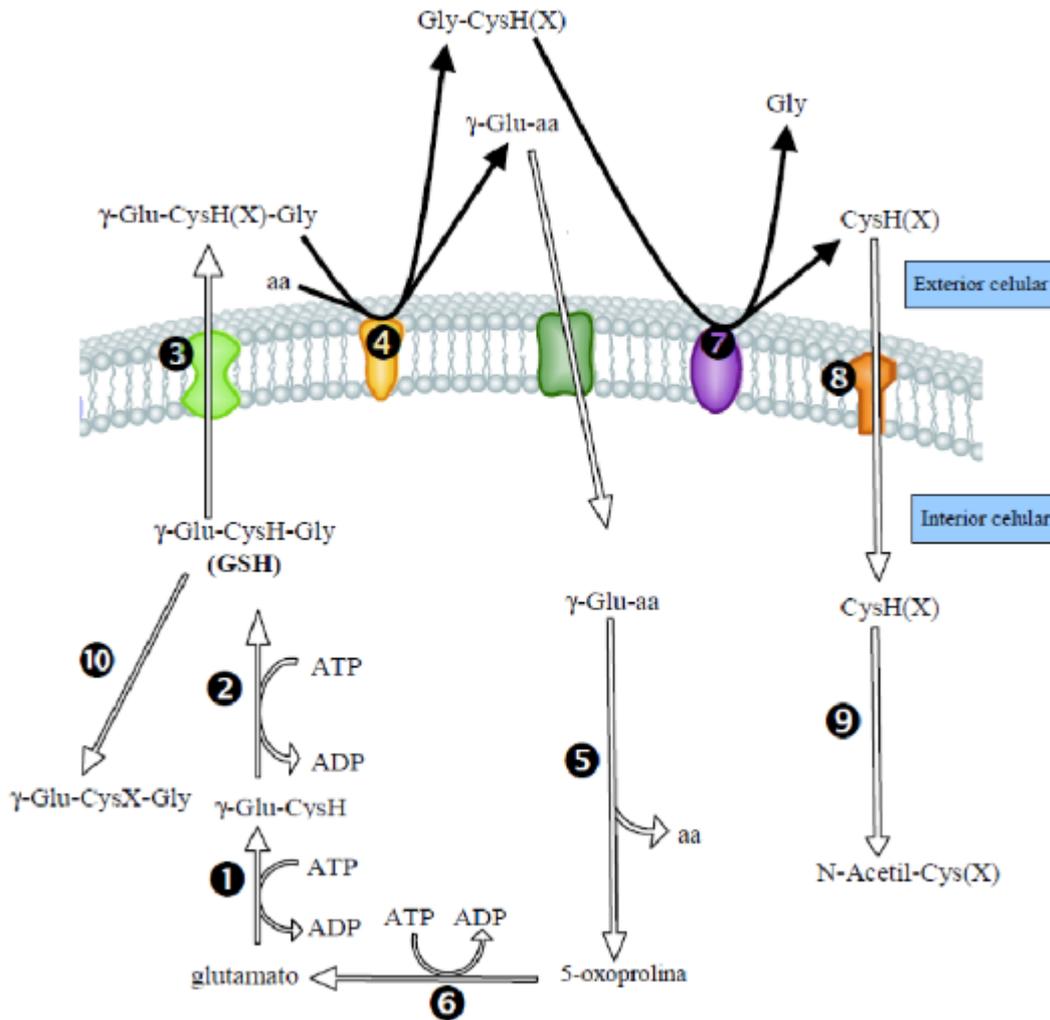
El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas, muchas de las cuales se deben a su estructura química. El grupo tiol (-SH) de la cisteína es el que interviene en las reacciones redox, mientras que el enlace γ -glutamilo entre la glutamina y la cisteína le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) localizada en la membrana celular [232].

El conjunto de las reacciones enzimáticas que participan en la síntesis y degradación del GSH constituye el llamado ciclo del γ -glutamilo [233].

I.5.1.1 Síntesis y degradación del glutatión

La síntesis del GSH se inicia con la síntesis de γ -glutamilcisteína por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) a partir del glutamato y L-cisteína (Reacción 1) [230]. La γ -GCS también se conoce como glutamato-cisteína ligasa [234]. En condiciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de GSH es

la disponibilidad de cisteína [235]. La síntesis de GSH está regulada por retroalimentación negativa, ya que el GSH inhibe la γ -glutamilcisteína sintetasa [236]. La segunda reacción está catalizada por la GSH sintetasa (GS), que añade una glicina a la γ -glutamilcisteína (γ -Glu-Cys) (Reacción 2). El GSH sintetizado intracelularmente es transportado al exterior celular (Reacción 3).



1. γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS); 2. glutación sintetasa (GS); 3. Salida de GSH; 4. γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT); 5. γ -glutamil ciclotransferasa; 6. Oxoprolinasa; 7. dipeptidasa; 8. sistema ASC y sistema Xc; 9. Acetilación; 10. glutación S-transferasa (GST)

Figura 1.64 Ciclo del γ -glutamilo

Benlloch, M. (2008) *Depleción de GSH y Bcl-2 en células de Melanoma maligno B16: mecanismos de sensibilización frente al estrés oxidativo/nitrosativo y la quimioterapia* [61]

La γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) y la cisteinil-glicina dipeptidasa catalizan la degradación del GSH a sus aminoácidos constituyentes (Reacción 4) [233]. La γ -GT 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 y su dominio activo se orienta hacia el 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 (Reacción 5). La oxoprolinasa cataliza la hidrólisis dependiente de ATP de la oxoprolina, lo cual libera glutamato para la síntesis de GSH (Reacción 6) [237]. También son sustrato de la γ -GT los conjugados de GSH (γ -Glu-CysH(X)-Gly) producidos por la reacción catalizada por la glutatión S-transferasa (GST) (Reacción 10). Dicha enzima de detoxificación cataliza las reacciones entre GSH y una amplia variedad de compuestos electrofílicos de origen exógeno.

Una dipeptidasa hidroliza la cisteinilglicina formada por la γ -GT (Reacción 7) [232]. Existen diferentes mecanismos para el transporte de la cisteína y de equivalentes de cisteína al interior celular. El sistema ASC (sistema de transporte de aminoácidos neutros sodio dependiente, que principalmente transporta alanina, serina y cisteína) introduce cisteína extracelular [238], [239]. Pero debido a que los niveles de cistina en el medio extracelular son más elevados que los de cisteína libre, los sistemas biológicos poseen un sistema de transporte con una elevada especificidad para la cistina y el glutamato y sodio independiente llamado sistema X_C^- (Reacción 8) [240]. El grupo amino de la cisteína es acetilado, dando origen a derivados del ácido mercaptúrico, metabolitos que serán excretados en la orina (Reacción 9) [241].

1.5.1.2 Papel del glutatión en la fisiología celular

La función principal del GSH es como antioxidante en la defensa frente a compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) o endógenos (como los radicales libres). El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna, o bien puede reducir los peróxidos por medio de la GPx. En presencia de estrés oxidativo, el GSH neutraliza radicales libres y peróxidos a través de su oxidación a GSSG, el cual es reducido de nuevo a GSH por medio de la glutatión reductasa (GR), utilizando NADPH como cofactor [241].

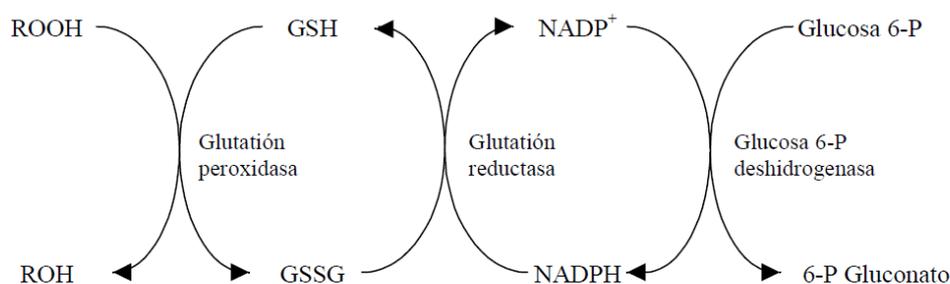


Figura 1.65 Ciclo redox del glutatión

Adaptado de Deneke, S. y Fanburg, B. (1989) *Regulation of cellular glutathione* [240]

El GSH también interviene en la síntesis del ADN. 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, dependientes de GSH. La tiorredoxina transfiere a la ribonucleótido reductasa los

electrones suministrados por la tiorredoxina reductasa y por NADPH. La glutaredoxina utiliza el GSH para proporcionar el poder reductor de la ribonucleótido reductasa; para ello utiliza el GSH reducido por la glutación reductasa [242], [243].

El GSH está implicado en el mantenimiento del estado redox y en la regulación transcripcional. Un gran número de procesos celulares se ven afectados por el estado redox de la célula, en el que el GSH tiene un papel fundamental. Un elevado número de moléculas de señalización se activan por el estado redox del GSH, ya sea directamente, o indirectamente a través de la interacción con los radicales libres. Por ejemplo, la proteína activadora 1 (AP-1), responsable de la expresión de un número de genes incluyendo los de muchas citoquinas, el TGF- β y la colagenasa, la proteína activadora 2 (AP-2), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK), la proteína quinasa C (PKC) y la tirosina quinasa. Estas moléculas están implicadas en procesos celulares tales como la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis. Por otra parte, una disminución en el nivel de GSH es capaz de estimular la activación de NF- κ B. De este modo, el GSH es capaz de regular indirectamente la expresión de genes que contienen el sitio de unión de NF- κ B en su promotor, incluyendo numerosas citoquinas, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular. Esta activación está bloqueada por antioxidantes tales como el precursor del GSH N-acetil L-cisteína y otros compuestos tiólicos [229]. El estrés oxidativo sostenido puede provocar modificaciones en la estructura de las proteínas quinasas, pudiendo resultar en la inhibición de la proliferación celular, e incluso, la muerte celular por apoptosis.

También se encuentra implicado en la modulación de la respuesta inmune, pudiendo aumentar la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T. A su vez, realiza otras funciones entre las que se incluyen: la protección frente a las radiaciones ionizantes, la captación de aminoácidos en algunos tejidos, actuar como reservorio de cisteína, la modulación de actividades enzimáticas, la regulación de la homeostasis del calcio, la regulación del ciclo celular, la proliferación celular, la función proteica y los mecanismos mitocondriales implicados en la apertura del mPTP asociado a la activación de la apoptosis [241].

Debido a estas funciones del GSH y al rol de las ROS/RNS en la señalización celular y en la patogénesis de muchas enfermedades, alteraciones en los niveles de GSH y en su metabolismo se asocian con diversas patologías incluyendo el cáncer, el SIDA, el Alzheimer, el Parkinson, los infartos de miocardio, los accidentes cerebrovasculares y la diabetes [231].

I.5.1.3 Cociente GSH/GSSG como indicador del estado redox

El cociente GSSG/GSH está considerado como uno de los indicadores más fiables del estado redox intracelular. De este modo, el aumento de la concentración de glutación oxidado, aumenta el cociente GSSG/GSH y es indicativo de la presencia de estrés oxidativo [244].

1.5.1.4 Regulación negativa de los niveles de GSH

La utilización de peróxidos orgánicos es una aproximación experimental muy útil para definir los mecanismos por los que los radicales libres dañan las células y para explorar el potencial de los antioxidantes citoprotectores [245].

Entre los compuestos utilizados para inducir estrés oxidativo, se encuentran una serie de sustancias oxidantes que disminuyen de forma rápida los niveles intracelulares de GSH, con el consecuente aumento de los niveles GSSG y la oxidación de proteínas y otros compuestos celulares. Los oxidantes más habituales para inducir estrés oxidativo son el peróxido de hidrógeno y el tert-butil hidroperóxido.

El tert-butil hidroperóxido (t-BOOH) induce una serie de alteraciones celulares que incluyen la peroxidación de lípidos de membrana, la depleción de glutatión y otros tioles, la alteración de la homeostasis del calcio y el daño al ADN, que conduce finalmente a la muerte celular [246], [247].

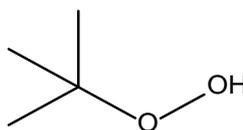


Figura 1.66 Estructura del tert-butil hidroperóxido

Un segundo grupo de sustancias son los aminoácidos sulfoximina, los cuales provocan la disminución de GSH a través de la inhibición de su síntesis, mediante el bloqueo de la actividad de las enzimas γ -GCS y/o GS. La sustancia más utilizada, no sólo en experimentación básica sino también en ensayos clínicos, es la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), un potente inhibidor de la γ -GCS. De este modo se bloquea la síntesis de γ -glutamilcisteína y, por tanto, de GSH [248].

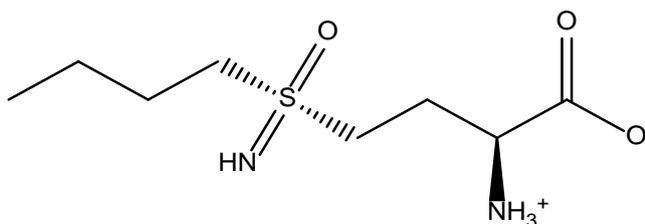


Figura 1.67 Estructura de la L-butionina-[S,R]-sulfoximina

El tratamiento con BSO reduce los niveles de GSH en la mayoría de los tejidos y en el plasma sanguíneo, así como en gran variedad de tumores. Se ha demostrado que el tratamiento previo con BSO, a través de la disminución de GSH, sensibiliza a las células tumorales resistentes al tratamiento con drogas citotóxicas, como los compuestos de platino y agentes alquilantes, y con radiaciones ionizantes [249].

La BSO y otros agentes que producen depleción de los tioles no son específicos, por lo que producen depleción no sólo en los tejidos tumorales, sino también en los tejidos normales, provocando daños irreversibles. La depleción de GSH sólo parece ser terapéuticamente efectiva cuando se alcanzan niveles muy bajos en las células cancerígenas. [241]

I.5.2 Glutación, apoptosis y cáncer

El GSH es esencial para la supervivencia celular. La presencia de niveles elevados de GSH está relacionada con la resistencia a la apoptosis y que la depleción de GSH induce o potencia la apoptosis [230], [250], [251]. La BSO induce la depleción de GSH sin desencadenar la apoptosis, pero facilita y potencia la respuesta a otros estímulos de muerte; por ejemplo, potencia la apoptosis inducida por receptores de muerte en células T y aumenta la susceptibilidad al tratamiento con TNF- α en ratones con tumor ascítico de Ehrlich [250]. Por el contrario, la suplementación de GSH con N-acetil-L-cisteína (NAC) previene la apoptosis [230].

Se ha demostrado que el GSH mitocondrial regula la apertura de los poros de permeabilidad mitocondrial y la liberación de señales moleculares proapoptóticas al citosol [241]. Cabe destacar que las mitocondrias no pueden sintetizar GSH, por lo que los niveles de GSH mitocondrial dependen de su transporte desde el citosol hasta la matriz mitocondrial (un mecanismo donde GSH y glutamato compiten).

El metabolismo de glutación con respecto al cáncer es capaz de desempeñar tanto un papel protector como patogénico. Su papel en la eliminación y la detoxificación de sustancias cancerígenas es fundamental y la alteración de sus niveles puede afectar a la supervivencia celular. Sin embargo, por su papel protector celular frente al daño inducido por radicales libres, confiere resistencia a las células tumorales frente a las radiaciones ionizantes y a los fármacos quimioterapéuticos; de este modo, niveles elevados de glutación en las células tumorales son capaces de protegerlas en diversos tipos de cáncer, como cáncer de médula ósea, mama, colon, laringe y pulmón [184], [185], [229], [241], [252]–[254]. Se ha observado que para la sensibilización de la célula a la radioterapia es necesario un paso previo de depleción entre el 50-60 % del GSH nuclear [251].

En estudios anteriores, se observó la relación entre los niveles de GSH asociados al crecimiento celular y la actividad metastática; en estudios *in vitro* en células de melanoma murino B16M, se encontró que las células tumorales con un elevado contenido en GSH mostraban una mayor capacidad invasiva. Se observaron niveles de GSH mayores en placas de cultivo donde las células se encontraban a baja densidad (LDB16M) que en placas confluentes (HDB16M). Tratando las placas confluentes con éster de GSH, las células recuperaban tanto los niveles de GSH como la capacidad metastática de las LDB16M. Por otra parte, tratando las placas de baja densidad celular con BSO, se inhibía específicamente la síntesis de GSH y se disminuía la capacidad de metástasis [255].

Como ya hemos comentado, la alteración en los componentes de las vías de muerte celular habitualmente genera resistencia a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. Las terapias combinadas con fármacos que ayuden a restablecer la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis es una de las estrategias más prometedoras a día de hoy en el tratamiento del cáncer. Investigaciones recientes sugieren que los polifenoles naturales podrían utilizarse para sensibilizar las células tumorales a la acción de la quimioterapia y la radioterapia mediante la inhibición de las vías que conducen a la resistencia al tratamiento [203], [241], [250].

Capítulo II

Hipótesis de trabajo

El estrés oxidativo representa un mecanismo de acción subyacente a la fisiopatología de numerosas enfermedades entre las que se encuentra el cáncer. Muchas sustancias con capacidad antioxidante reducen el estrés oxidativo y su acción puede repercutir sobre el comportamiento de las células malignas.

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas con un gran potencial antioxidante. Así mismo se ha podido demostrar el efecto antitumoral de algunos de estos compuestos fenólicos, que inhiben el crecimiento de distintas células tumorales en cultivo. Algunos de estos efectos anticancerígenos pueden atribuirse a su papel antioxidante, mientras que otros están relacionados con su capacidad para inducir muerte celular.

El glutatión (GSH) es el tiol no proteico más abundante en nuestras células y un factor esencial de nuestras defensas antioxidantes. El GSH está involucrado tanto en la regulación de la proliferación celular como de la muerte por apoptosis. Es por tanto pausable que los efectos antitumorales de los polifenoles naturales estén relacionados molecularmente con los niveles intracelulares de GSH o, que al menos, la depleción tenga efectos sinérgicos con los inducidos por los polifenoles.

Capítulo III

Objetivos

Los objetivos concretos que se han planteado en este trabajo son:

- Estudio del efecto antioxidante del resveratrol sobre los niveles de 8-oxo-dG, MDA, GSH y GSSG en fibroblastos de ratón sometidos a un inductor de estrés oxidativo.
- Estudio de los efectos de la adición de diversos polifenoles (t-pterostilbeno, resveratrol y quercetina) y su posible efecto antiproliferativo *in vitro* en distintas líneas tumorales.
- Estudio de la variación de los niveles de GSH y su papel en el mecanismo de acción antitumoral.
- Estudio del efecto de los polifenoles sobre el crecimiento *in vitro* en células deplecionadas de GSH.

Para ello se ha realizado experimentación *in vitro* mediante el cultivo de diversas líneas celulares: una línea no tumorigénica de fibroblastos de ratón (Balb/c 3T3) y cuatro líneas tumorales distintas, cada una perteneciente a un tipo de cáncer: melanoma (A-375), pulmón (A-549), mama (MCF-7) y colon (HT-29). Todas procedentes de la ATCC (American Type Culture Collection, EEUU).

Capítulo IV

Material y metodología

IV.1 Materiales

IV.1.1 Sustrato biológico: Cultivos celulares

En el presente trabajo hemos utilizado una línea no tumorigénica de fibroblastos de ratón (Balb/c 3T3) y cuatro líneas tumorales distintas, cada una perteneciente a un tipo de cáncer. Todas proceden de la ATCC (American Type Culture Collection, EEUU).

Tanto la preparación de los medios como la manipulación de las células, se han realizado en condiciones de asepsia utilizando cabinas de flujo vertical. Las células se han dejado crecer a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y antes de que las células alcancen la confluencia se realiza un pase de las mismas. Se despegan las células por tripsinización (tripsina 0.25 %, EDTA 1 mM en PBS pH 8.0; Invitrogen) durante aproximadamente 5 minutos, hasta que se observe al microscopio que las células se han despegado del soporte.

Los experimentos se han realizan en las instalaciones de Cultivos Celulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

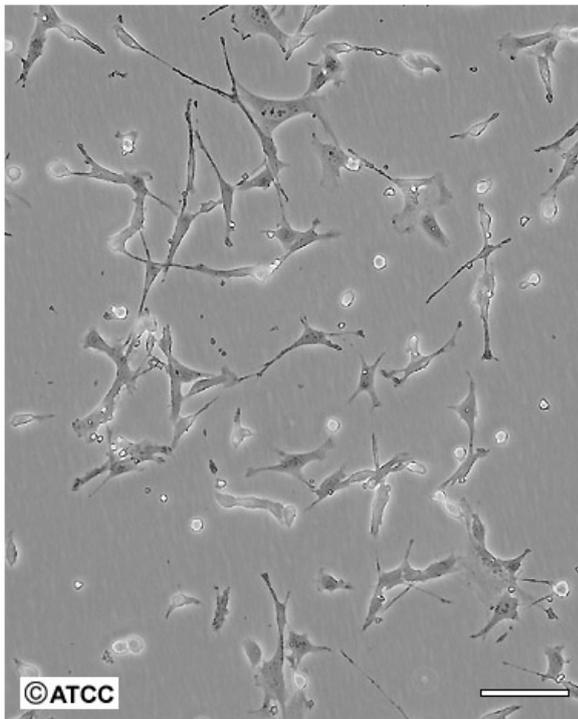
IV.1.1.1 Fibroblastos de ratón Balb/c 3T3

Las células 3T3 provienen de una línea celular establecida en 1962 por G. Todaro y H. Green (Department of Pathology, New York University School of Medicine) obtenida de tejido embrionario de ratón albino suizo [256] y se han convertido en la línea celular estándar de fibroblastos.

La denominación "3T3" proviene de transferencia de 3 días, inóculo de $3 \cdot 10^5$ células. Los fibroblastos fueron transferidos cada 3 días e inoculados a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células por placa de 20 cm². Su inmortalización con una tasa de crecimiento estable se produjo tras 20-30 generaciones en cultivo.

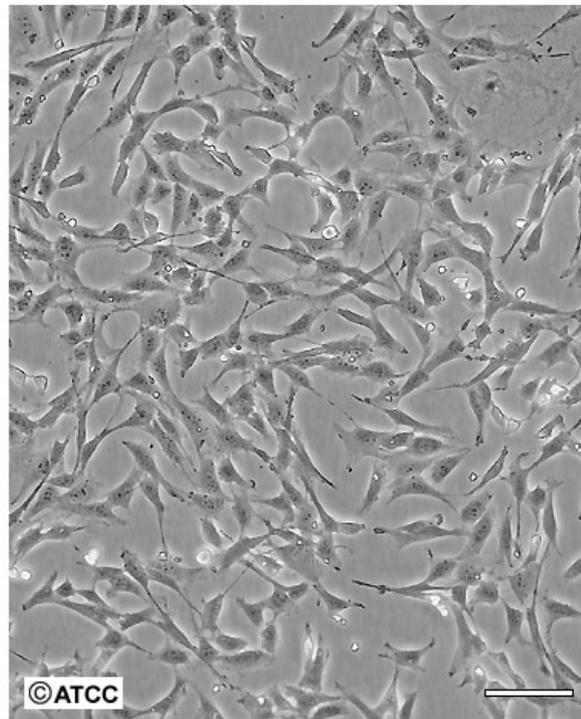
La línea BALB/3T3 clon A31 es una de las líneas celulares desarrolladas por S. Aaronson y G. Todaro en 1968 a partir de embriones desagregados de ratón BALB/c de 14-17 días [257]. Depositada en la ATCC con referencia CCL-163.

ATCC Number: **CCL-163**
Designation: **BALB/3T3 clone A31**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

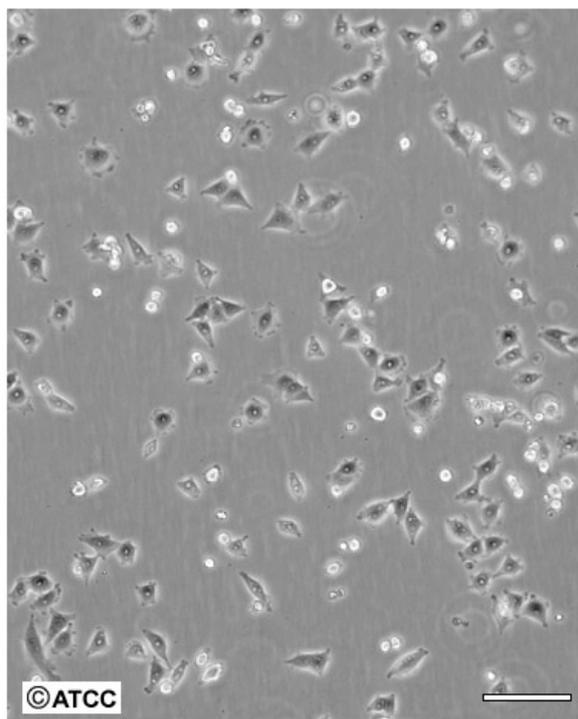
Fotografía IV-1

IV.1.1.2 Melanoma (A-375)

La línea tumoral de melanoma maligno humano A-375 es una línea celular de crecimiento amelanótico derivada de una mujer de 54 años de edad, obtenida por D.J. Giard (1973) [258] y depositada en la ATCC con referencia CRL-1619.

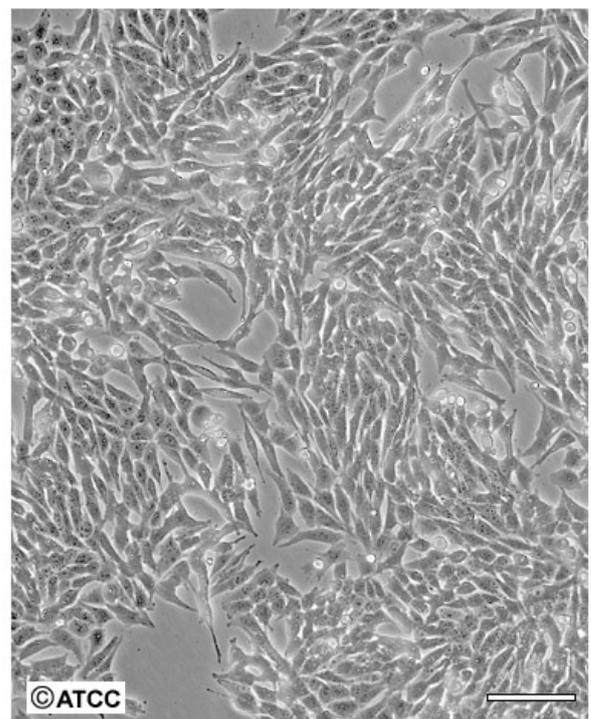
Se utiliza con asiduidad como modelo experimental de melanoma humano. Tiene morfología epitelial y crecimiento adherente en monocapa.

ATCC Number: **CRL-1619**
Designation: **A-375**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

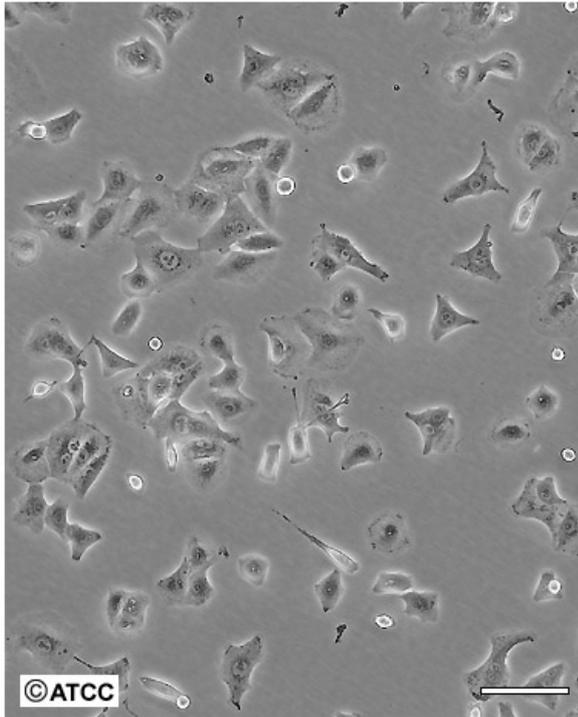
Scale Bar = 100µm

Fotografía IV-II

IV.1.1.3 Pulmón (A-549)

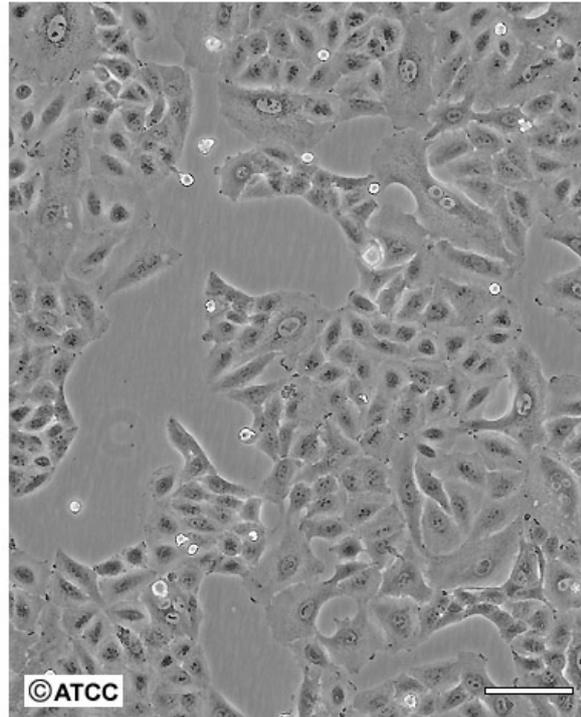
Esta línea tumoral también fue obtenida por D.J. Giard (1972) [258] y depositada por la ATCC con referencia CCL-185. Proviene de tejido carcinomatoso de pulmón de un varón de 58 años. Como en el caso anterior, tiene morfología epitelial y crecimiento adherente en monocapa.

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

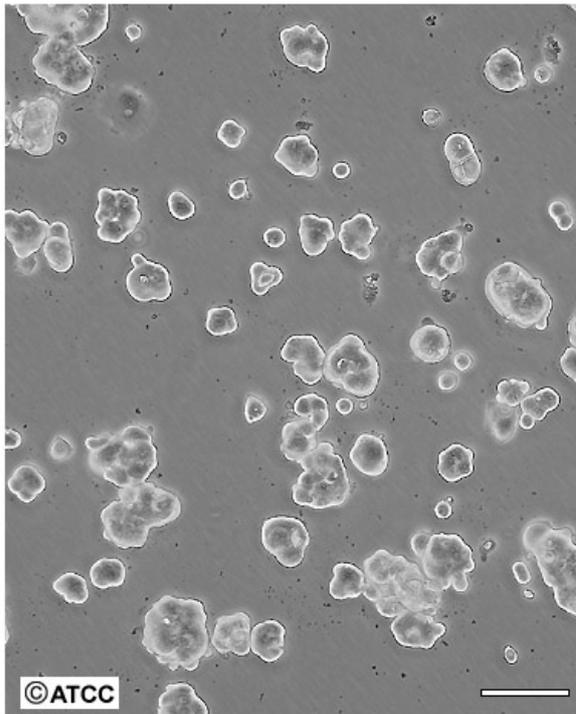
Scale Bar = 100µm

Fotografía IV-III

IV.1.1.4 Mama (MCF-7)

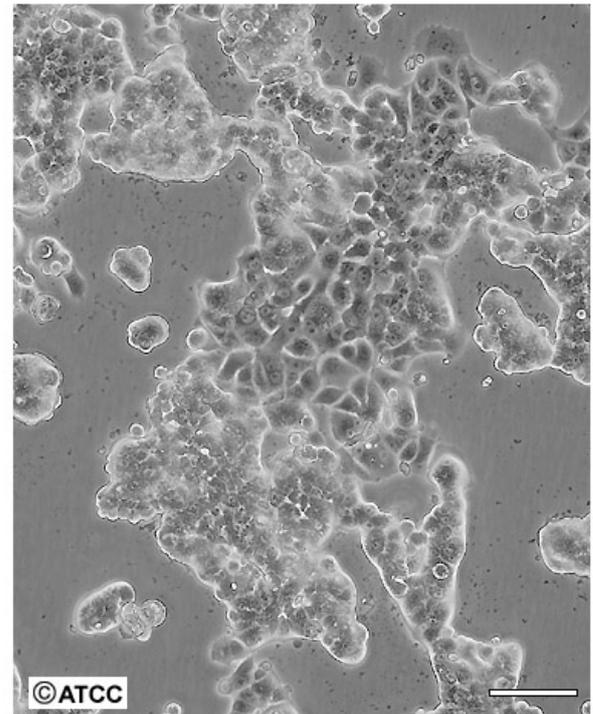
Esta línea tumoral fue obtenida a partir de una efusión pleural una mujer de 69 años con cáncer de mama. Establecida por H. Soule en 1973 [259] y depositada en la ATCC por C.M. McGrath. Referencia HTB-22. Tiene morfología epitelial y crecimiento adherente en monocapa.

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

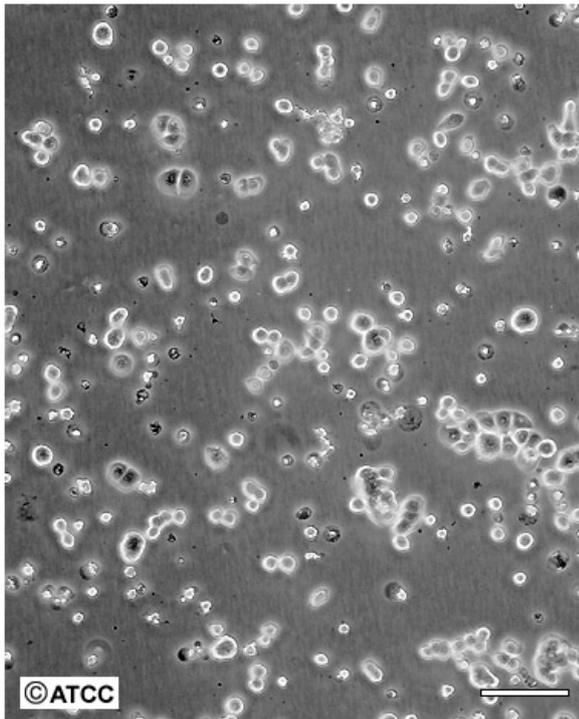
Scale Bar = 100µm

Fotografía IV-IV

IV.1.1.5 Colon (HT-29)

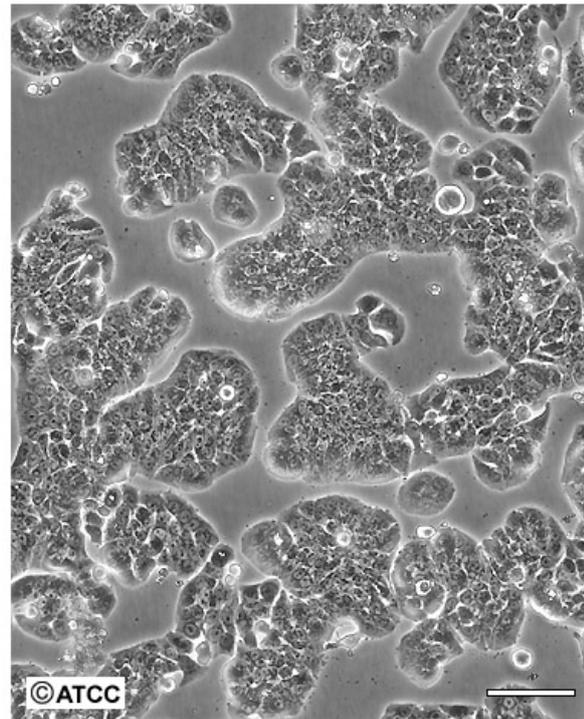
Esta línea tumoral fue obtenida a partir de tejido colorrectal de una mujer de 44 años. Establecida por J. Fogh en 1964 [260] y depositada en la ATCC. Referencia HTB-38. Tiene morfología epitelial y crecimiento adherente en monocapa.

ATCC Number: **HTB-38**
Designation: **HT-29**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Fotografía IV-V

IV.1.2 Equipamiento

IV.1.2.1 Equipamiento del departamento

- **Sistema de depuración de agua:** marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.
- **Autoclave:** Marca JP Selecta, modelo Autester S-437-G
- **Generador de hielo:** Marca Scotsman, modelo Icematic F100 AX2.

IV.1.2.2 Equipamiento del laboratorio

- **Centrifugas:**
 - Para las centrifugaciones a baja velocidad se ha utilizado una centrifuga refrigerada de la marca Eppendorf modelo 5702R.
 - Las centrifugaciones a alta velocidad se han realizado en una ultracentrifuga refrigerada de la firma Jouan modelo MR1812.
- **Espectrofotómetro:** Ultrospec 3000pro de Amersham Biosciences.
- **pHmetro:** el pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph, con un electrodo incorporado INGLOD.
- **Baño termostatzado:** con agitación automática regulable, marca Clifton, modelo Níkel electro LTD.
- **Balanzas:**
 - De precisión GR-120 A&D (Instruments LTD)
 - Electrónica: METTLER modelo PJ400.
- **Agitador magnético:** modelo ARE (VELT Científica).
- **Cromatógrafo líquido de alta eficacia:** HPLC modelo 515 de Waters, Spherisorb columnas ODS de Waters, detectores electroquímico y ultravioleta, electrodos coulométrico y amperométrico.
- **Lector automático de microplacas**

IV.1.2.3 Equipamiento del laboratorio de cultivos celulares

- Cabina de flujo laminar vertical, marca Telstar, modelo AV-100.
- Incubadora de CO₂, marca Nuair, modelo Autoflow 5510.
- Microscopio marca Hund Wetzlar Modelo Wilovert Standard HF 40
- Bomba de vacío, marca KNF modelo Laboport N86 KN.18

IV.1.3 Materiales e instrumental de laboratorio

IV.1.3.1 Material de laboratorio

- **Pipeteador** Biohit Midi Plus (Ref. 71093X, Biohit) para pipetas de plástico o vidrio entre 1-100 ml.
- **Pipetas y micropipetas:**
 - Pipetas Eppendorf Reference®: 0,1–2,5 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL y Labsystems Finnpipette®: 0,5–10 µL
 - Puntas de pipeta Eppendorf® 5–200 µL y 100–1000 µL (Ref. 162001 y 163007 Nirco S.L.)
 - Pipetas pasteur de vidrio de 230 mm
 - Pipetas pasteur de vidrio de 150 mm
 - Pipetas pasteur de plástico estériles desechables de 3 ml
 - Pipetas Serológicas 1, 2, 5, 10 y 25 ml estéril individual TPP®
- **Tubos de microcentrífuga** de 1,5 cm y 2 cm Eppendorf®
- **Tubos graduados de centrífuga** con tapón de rosca de 15 ml y 50 ml Sarstedt®
- **Cubetas desechables semi-micro 1,5 ml**
- **Material de vidrio:** Erlenmeyers, matraces, probetas, varillas de vidrio, embudos, vidrio de reloj.

IV.1.3.2 Material de cultivos celulares

- **Frascos y placas de cultivo:** El cultivo de las líneas celulares fue realizado en frascos desechables de 75 y 150 cm² de superficie (Ref. 353136 y 355001, BD Biosciences Falcon®), en placas de cultivo de 6 pocillos (Ref. 353046, BD Biosciences Falcon®) y en placas Petri de 10 ml (Ref. 353003, BD Biosciences Falcon®).
- **Cámara de Neubauer mejorada** ref. 236-8100104 y cubre-cámaras cuentaglobulos ref. 013-552026 de Levantina de Laboratorios S.L.
- **Medios de cultivo:**
 - El cultivo de las células Balb/c 3T3 se realizó con RPMI 1640 Medium (1X), liquid with GlutaMAX™ I. (Ref. 61870-044 Invitrogen, Gibco®) suplementado con penicilina (100 U/ml) - estreptomycin (100 mg/ml) (Ref. 15140-122 Invitrogen, Gibco®), anfotericina B (100 mg/ml, Ref. 15290-018 Invitrogen, Gibco®) y suero fetal de ternera 10% (NCS, Invitrogen, Gibco®).
 - El mantenimiento de las células tumorales de las líneas A-375, A-549 y HT-29 se realizó con el medio de cultivo D-MEM Media - GlutaMAX™-I Dulbecco's Modified

Eagle Medium (D-MEM) (1X), liquid (High Glucose) (Ref. 31966-047 Invitrogen, Gibco®) suplementado con penicilina (100 U/ml) - estreptomycin (100 mg/ml) (Ref. 15140-122 Invitrogen, Gibco®), anfotericina B (100 mg/ml, Ref. 15290-018 Invitrogen, Gibco®) y suero bovino fetal 10% (FBS , Ref. 10270-106 Invitrogen, Gibco®).

- Por otro lado, el cultivo de la línea MCF-7 se efectuó con RPMI 1640 medium (1X), liquid with GlutaMAX™ I. (Ref. 61870-044 Invitrogen, Gibco®) suplementado con penicilina (100 U/ml) - estreptomycin (100 mg/ml) (Ref. 15140-122 Invitrogen, Gibco®), anfotericina B (100 mg/ml, Ref. 15290-018 Invitrogen, Gibco®) y suero bovino fetal 10% (FBS , Ref. 10270-106 Invitrogen, Gibco®).

- **Soluciones tamponadas:**

- Tampón fosfato en solución salina a pH 7.4 (PBS, Phosphate buffered saline PBS (1X), liquid - pH: 7.4 ± 0.05, Ref. 10010-056 Invitrogen, Gibco®).
- Tripsina-EDTA (Trypsin, 0.25% (1X) with EDTA 4Na, liquid, Ref. 25200-072 Invitrogen, Gibco®).
- Tampón Kpi 0,2M-EDTA 1mM pH=7 (formado por KH₂PO₄ 0,2M-EDTA 1mM y K₂HPO₄ 0,2M-EDTA 1mM)

- di-Potasio Hidrógeno Fosfato 3-hidrato (K₂HPO₄·3H₂O, Panreac®)
- Potasio di-Hidrógeno Fosfato 3-hidrato (KH₂PO₄·3H₂O, Panreac®)
- Solución de PCA 6%-EDTA 1 mM
- Dimetil sulfóxido (DMSO, Ref. D5879, Sigma-Aldrich®).
- Azul de tripano (Ref. 15250-061, Invitrogen, Gibco®).
- L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO, Ref. B2640, Sigma-Aldrich®)
- Tert-butil hidroperóxido (Ref. 458139, Sigma-Aldrich®)
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB, Ref. 237329, Sigma-Aldrich®)
- Glutación S-Transferasa (GST, Ref. G6511, Sigma-Aldrich®)
- Resveratrol (Ref. R5010, Sigma-Aldrich®), Pterostilbeno (Green Molecular®), Quercetina (Ref. Q4951, Sigma-Aldrich®)
- Filtros jeringa de acetato de celulosa de 25 mm de diámetro y poro de 0,2 µm.
- Rascador de células (Corning® cell scrapers blade L 1.8 cm, handle L 25 cm, Ref. CLS3010-100EA, Sigma)
- Criotubos estériles 1,8mL (Nunc)
- Placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Ref. 92096, TPP®).

IV.2 Métodos

IV.2.1 Cultivo de las líneas celulares.

El cultivo celular hace referencia a un disgregado celular de un tejido. El cultivo de tejidos fue desarrollado a comienzos del siglo XX para estudiar el comportamiento de células animales en ausencia de las variaciones sistémicas que puedan tener lugar *in vivo*, ya sea en condiciones normales o bajo el estrés de un experimento [261].

Una línea celular continua es un cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano, en muchos casos de un tumor, y que se mantiene en cultivo un tiempo ilimitado.

IV.2.1.1 Utilización

Actualmente, los cultivos de células constituyen una de las herramientas más útiles en la investigación biológica, tanto básica como aplicada. Se utilizan en estudios sobre la bioquímica y la fisiología celular (fenómenos de metabolismo y transporte celular); en virología (cultivo de virus, relaciones huésped-parásito); genética (localización y control de la expresión de genes); estudios sobre el desarrollo embrionario (fenómenos de diferenciación y desdiferenciación); carcinogénesis (transformación maligna); obtención de clones (producción de anticuerpos monoclonales, células madre, etc.) Entre las principales aplicaciones prácticas de los cultivos celulares destacan los estudios de toxicidad (productos químicos, farmacéuticos); el diagnóstico de enfermedades (genéticas, metabólicas, infecciosas, tumorales); la reproducción asistida (inseminación artificial, fecundación *in vitro*); la obtención de productos farmacéuticos (hormonas, vacunas, anticuerpos); la cirugía reconstructiva y la medicina regenerativa (terapia génica, trasplantes de células) [262].

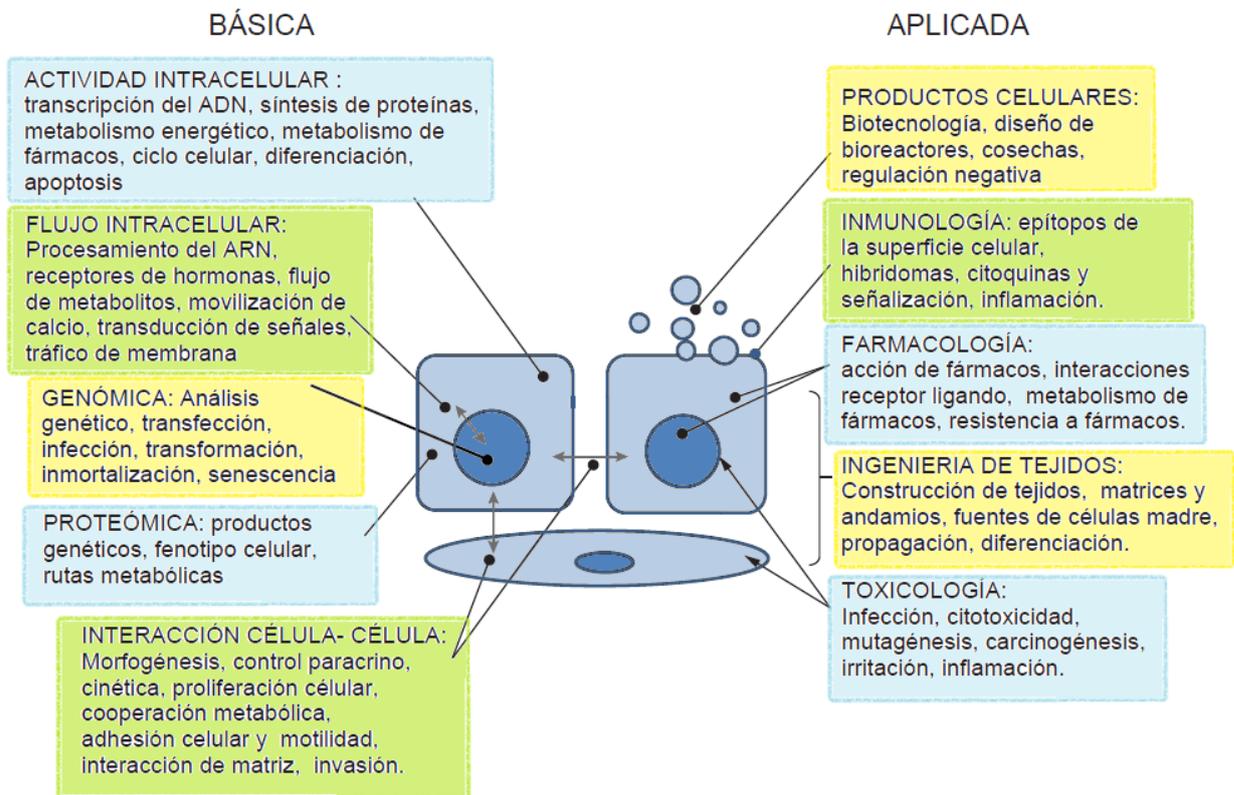


Figura IV.1 Utilización de los cultivos celulares en investigación básica y aplicada
Adaptado de Freshney, I. (2010) *Culture of animal cells* [261]

IV.2.1.2 Ventajas y desventajas

Los cultivos celulares presentan diversas ventajas:

- Permiten un control preciso del ambiente (pH, temperatura, presión osmótica, % O₂ y CO₂ en atmósfera) y de las condiciones fisiológicas.
- Caracterización y homogeneidad de la muestra, con lo que se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.
- Suponen una economía en el uso de reactivos o fármacos a estudiar, pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo.
- El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo in vivo pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

En cuanto a las desventajas, podemos destacar:

- Necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación, ya que el crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas...).
- El costo de producción de 1g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal.
- Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.
- Validez del modelo in vitro, en cuanto a un estudio in vivo, hay que diferenciar que:
 - Se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
 - Se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. Es de destacar que los avances más excitantes en la función celular proceden del reconocimiento de la importancia de las interacciones específicas de las células con otras células o con el sustrato.
 - Carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis in vivo.
 - Cuando se establece el cultivo, las células se desdiferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta desdiferenciación puede ser revertida en algunos casos.

IV.2.1.3 Medidas de seguridad

- La preparación de los medios como la manipulación de las células, se debe realizar en condiciones de asepsia, para ello se utilizan cabinas de flujo vertical.
- Antes de empezar el trabajo, se debe encender la cabina un par de minutos para asegurarse que el aire del interior está limpio, además es conveniente limpiar toda la superficie con una solución de etanol al 70%.
- Se deben utilizar pipetas estériles, tubos y frascos de cultivo estériles y desechables, y puntas de pipeta autoclavables.

- Si durante el transcurso de los experimentos ocurre cualquier accidente por el cual se pueda presuponer contaminación, hay que desechar inmediatamente todo el material que haya podido estar en contacto con el material contaminado y utilizar células frescas.

IV.2.1.4 Preparación del medio de cultivo

Antes de proceder a la preparación del medio, inactivamos el complemento del suero bovino fetal, para ello calentar la botella a 57°C durante 1h. Seguidamente, alicuotamos las botellas de:

- Fungizone® Antimycotic (Ref. 15290-018 Invitrogen) en alícuotas de 1 ml.
- Penicillin-Streptomycin (Ref. 15140-122 Invitrogen) en alícuotas de 5 ml.
- Fetal Bovine Serum Origin: EU Approved (South American) (Ref. 10270-106 Invitrogen) ya inactivado en alícuotas de 50 ml.

Conservamos las alícuotas a -20°C.

Añadimos a una botella de DMEM o RPMI, según el caso, una alícuota de cada. Una vez preparado el medio anotar la fecha de preparación y conservar en nevera.

IV.2.1.5 Descongelación de células

Preparamos el baño a 37°C y esperamos a que alcance esta temperatura.

Preparamos un tubo de centrifuga con 30-40 ml de PBS. Seguidamente sacamos el criotubo con las células del tanque de nitrógeno y lo sumergimos inmediatamente en el baño a 37°C. Mantenemos el criotubo en el baño, agitándolo suavemente hasta que se descongele. Lavamos la superficie del vial con etanol de 70% y lo trasladamos a la cabina de flujo laminar. Agitamos el contenido del criotubo con una pipeta y lo transferimos cuidadosamente al tubo de centrifuga. Lavamos el vial con PBS para recoger los restos y lo añadimos al tubo de centrifuga.

Centrifugamos a 500g (o rcf) 4 min a 4°C. En algunos casos, resulta más efectivo obviar la centrifugación y sembrar directamente las células en un frasco de cultivo y, posteriormente, una vez que las células están adheridas al frasco, retirar el medio de congelación con DMSO y las células muertas y añadir medio fresco.

Aspiramos el sobrenadante, añadimos más PBS y volvemos a centrifugar. Desechamos el sobrenadante y resuspendemos las células en medio de cultivo. Sembramos en un T75, ya que congelamos unas $3 \cdot 10^6$ células en el vial.

En la parte superior del frasco anotamos: nombre de la línea celular, número de pase o subcultivo y fecha. Metemos el frasco en el incubador.

Pasadas 6-12 horas, cuando las células se han adherido al frasco de cultivo, retirar el medio de cultivo con las células muertas y restos celulares y añadir medio nuevo.

IV.2.1.6 Subcultivo de líneas celulares continuas en monocapa

Precalemos el medio, el PBS y la tripsina en un baño a 37°C. Limpiamos la campana con etanol 70% y rociamos también las botellas antes de introducirlas en la campana.

Retiramos el medio del frasco de cultivo que estará en fase exponencial de crecimiento (células en monocapa al 100% de confluencia) por aspiración. Lavamos con PBS, vertiéndolo con cuidado en un lateral del frasco y moviéndolo con suavidad para repartirlo por toda la superficie. Así eliminaremos los restos de medio de cultivo para que la tripsina actúe directamente sobre las uniones de las células y no sobre los restos de proteínas.

Retiramos el PBS. Añadimos el volumen necesario de la solución de tripsina (ver tabla 4) e incubamos a temperatura ambiente durante 3-5 minutos (dependiendo de la línea celular).

Tabla IV-1

		<i>Capacidad (cm²)</i>	<i>V cubrir (ml)</i>	<i>Nº cél. a sembrar</i>	<i>Nº máx cél</i>	<i>V Tripsina (µl)</i>
Frascos	T150	150	30	3·10 ⁶	30·10 ⁶	3000
	T75	75	15	1,5·10 ⁶	15·10 ⁶	1500
	T50	50	10	10 ⁶	10·10 ⁶	1000
	T25	25	5	5·10 ⁵	5·10 ⁶	500
Placas (*)	P 6	10	2	2·10 ⁵	2·10 ⁶	200
	P 12	5	1	10 ⁵	10 ⁶	100
	P 24	2.5	0.5	5·10 ⁴	5·10 ⁵	50

(*) células/pocillo; 5 cm² → 1 ml

Comprobamos al microscopio que las células se han soltado de la superficie de cultivo. Añadimos PBS (o medio de cultivo) al frasco para detener el proceso de tripsinización. Lo recogemos con la misma pipeta y volverlo a tirar con un poco de fuerza sobre la cara donde estaban adheridas las células para favorecer su separación, del frasco y entre ellas.

Recogemos la suspensión de células y colocarlas en un tubo de centrifuga. Añadimos más PBS al frasco y repetir el proceso de modo el volumen total de suspensión sea de unos 35-40 ml. Centrifugamos a 500g (o rcf) durante 4 minutos a 4°C.

Aspiramos el sobrenadante y resuspendemos las células en 1 ml de medio (si está muy turbio añadir algo más porque el contaje con cámara de Neubauer tiene que salir entre 30-300 células).

Estimamos la concentración y viabilidad de las células. Añadimos el medio de cultivo necesario a un frasco nuevo (ver tabla 4) y sembramos las células.

En la parte superior del frasco anotamos: nombre de la línea celular, número de pase o subcultivo y fecha. Incubamos a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

IV.2.1.7 Congelación de células

Nos aseguramos de que la viabilidad celular es mayor de un 85%. Centrifugamos, eliminamos el sobrenadante y resuspendemos las células en medio de congelación, ajustando la concentración de células a $1-2 \cdot 10^6$ células/ml de medio de congelación (de modo que en el vial tengamos unas $3 \cdot 10^6$ células)

Llenamos los criotubos con la suspensión de células e los identificamos con el nombre de la línea celular, el número de pase, la fecha de congelación, la concentración de las células y su viabilidad.

Colocamos los criotubos en una caja de corcho, rodeado de material aislante y hacemos descender progresivamente la temperatura en diferentes congeladores: mantener los viales a 4°C durante 2 horas; agitar y colocar los viales a -20°C durante 2 horas, mantener a -80°C durante la noche y transferir a nitrógeno líquido al día siguiente.

IV.2.2 Estudio de proliferación y viabilidad celular.

La tasa de crecimiento y la viabilidad de los cultivos de células tumorales se valoran por exclusión con el colorante azoico azul tripán y conteo con cámara de Neubauer [261].

El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Las células con membrana íntegra no permiten la entrada del colorante, conservando un aspecto redondeado y transparente. Las células alteradas adquieren un tono azul, aunque conservan una morfología similar a las células viables.

Para ello, se mezcla la suspensión de células con un volumen de solución de azul tripán al 0.4 % (Invitrogen) y se carga en una cámara de Neubauer.

La Cámara de Neubauer es un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada y marcada L corresponde a 1 mm.

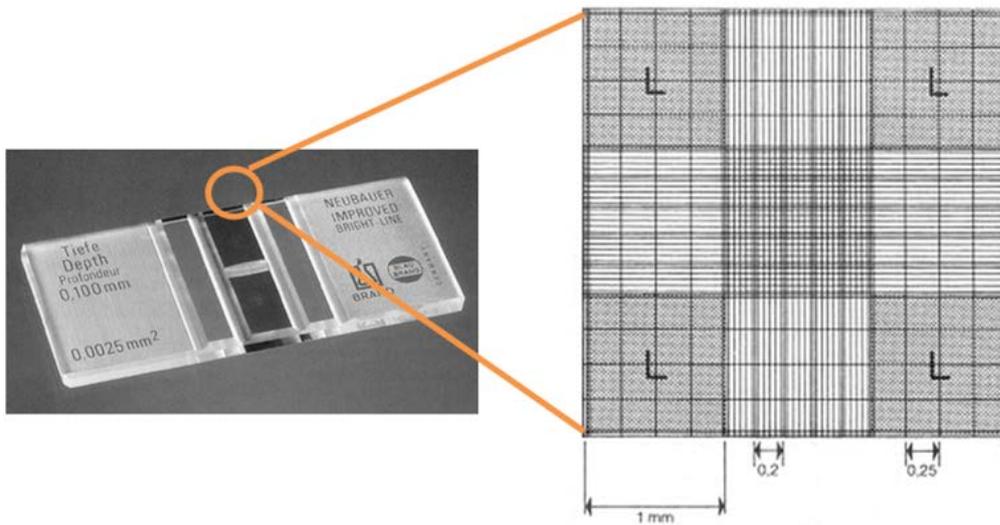


Imagen IV-VI

La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro.

El volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 mm = 0.1 μ l. Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

$$[Células] = \frac{x}{4} \cdot 10^4 \cdot FD \text{ (células/mL)} \quad [IV.1]$$

FD = *factor de dilución*

Observamos al microscopio si las células están más o menos distribuidas uniformemente por toda la cuadrícula (L) y si es así, contamos 4 cuadrados, siempre los mismos 4. Por ejemplo, las diagonales.

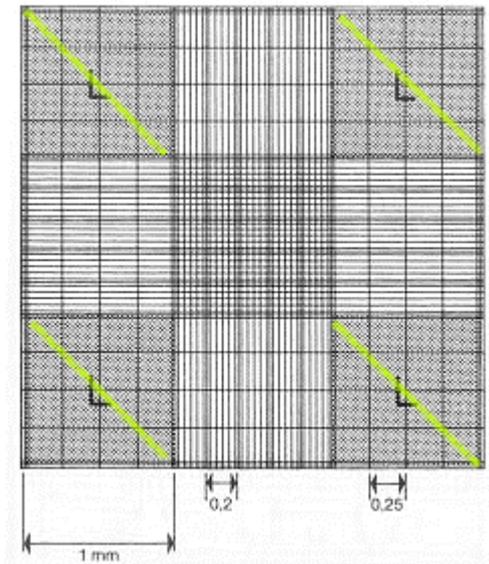


Imagen IV-VII

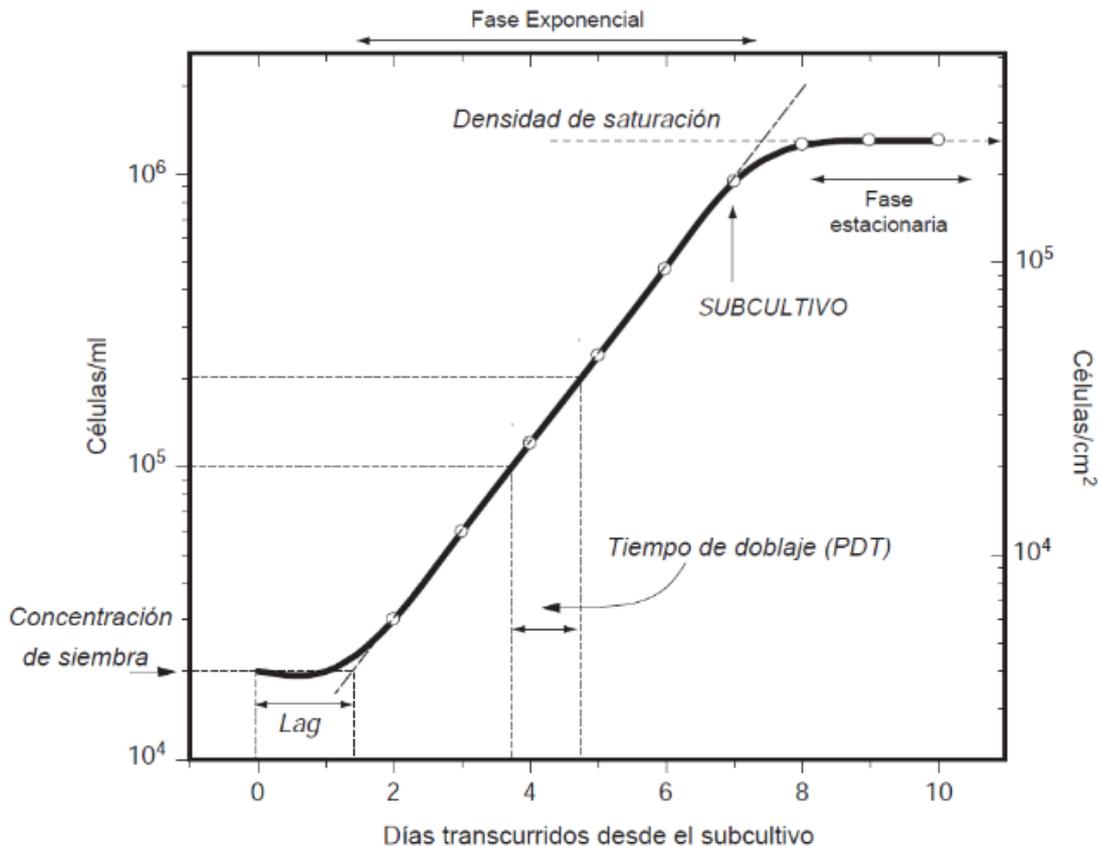
Calculamos la concentración de células.

$$[Células] = \frac{x}{A} \cdot 4 \cdot 10^4 \cdot FD = x \cdot 10^4 \cdot FD \text{ (células/mL)} \quad [IV.2]$$

IV.2.3 Curva de crecimiento

Durante el crecimiento de un cultivo podemos distinguir varias fases:

- Fase de latencia (período lag): Fijación al sustrato e inicio del ciclo celular.
- Fase de crecimiento exponencial: El número de células se duplica aproximadamente cada 24 horas.
- Fase de confluencia o estacionaria: Las células del cultivo, que se ha saturado, dejan de dividirse. En el caso de células en monocapa, la inhibición se produce por contacto; en el caso de células en suspensión, la inhibición se produce por consumo del medio.
- Fase de muerte: Si el cultivo se prolonga por demasiado tiempo, las células entran en una fase de senescencia que termina con la muerte de las mismas.



Gráfica IV-1 Curva de crecimiento

Adaptado de Freshney, I. (2010) *Culture of animal cells* [261]

Se realizaron curvas de crecimiento de cada una de las líneas celulares. Para ello se sembraron $2 \cdot 10^5$ células por pocillo en placas de 6 pocillos y se recogieron y contaron las células a las 12, 24, 48, 72 y 96h post-siembrar. Cada punto se realizó por triplicado y se hizo la media. Se representó el número de células frente al tiempo transcurrido desde la siembra.

IV.2.4 Tiempo de doblaje o PDT (Population doubling time)

En experimentación es necesario conocer la capacidad de proliferación de las líneas celulares, para poder estudiar la influencia tras modificar las células o su microambiente. El crecimiento celular se estudia asumiendo que cada célula se divide en 2, y el ratio de crecimiento depende de la duración del ciclo celular. El ratio de proliferación puede verse disminuido si se aumenta el tiempo que dura el ciclo o si solo una porción de la población se está dividiendo [263].

Asumiendo que cada célula individual se duplica en cada ciclo celular, y que sus hijas se duplican en el siguiente ciclo, se dice que el crecimiento sigue una tendencia exponencial, y la proliferación celular se puede cuantificar por la siguiente ecuación:

$$N_t = N_0 \cdot 2^g \quad [IV.3]$$

Donde:

N_t es el número de células a tiempo t

N_0 es el número de células inicial

g es el número de divisiones celulares en un determinado tiempo o número de generaciones

Podemos definir el tiempo de duplicación/doblaje (PDT, del inglés *population doubling time*) de una población como el tiempo de cultivo en fase exponencial (horas) dividido por el número de generaciones que se han producido en ese periodo de tiempo:

$$PDT = \frac{t}{g} \quad [IV.4]$$

Siendo g

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = \ln 2g \quad \ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = 0.693g$$

$$g = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{0.693} = 2.3 \times \frac{\log N_t - \log N_0}{0.693} \quad [IV.5]$$

$$g = 3.32(\log N_t - \log N_0)$$

Para obtener los PDT se escogieron dos puntos conocidos que se encontraran dentro de la zona de crecimiento lineal y calculamos el número de generaciones. Dividimos el tiempo de separación entre los dos puntos entre el número de generaciones.

IV.2.5 Aislamiento, cuantificación y digestión del ADN

Para la extracción de ADN se siguió el método de Gupta y cols., 1984, con la modificación descrita por Muñiz y cols., 1995 [264], donde se utiliza cloroformo-álcool isoamílico 24:1 en lugar de fenol para eliminar las proteínas.

Se tomaron aproximadamente 200 μ l de células mononucleadas resuspendidas en PBS a las que se le añadieron 2 ml de tampón Tris/ClH 1M (pH 7.5), NaCl 4M y EDTA 0.5M (pH 8), 50 μ l de Proteinasa K (400 μ g/ml) y 100 μ l de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20%. Se puso en baño durante 30 min a 56°C. A continuación se bajó la temperatura a a 37°C y se dejó durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron extracciones con cloroformo:isoamilalcohol 24:1, hasta que el sobrenadante quedó limpio separando ambas fases por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. A la

fase acuosa obtenida se le añadió NaCl 4M y a continuación se precipitó el ADN mediante la adición de 2 volúmenes de etanol 100% frío. Se invirtieron cuidadosamente los tubos varias veces hasta la formación de un precipitado blanquecino (madeja de ADN). Se guardó en nevera toda la noche.

Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante por decantación y se añadió etanol 70%. De nuevo se centrifugaron 15 minutos a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en 200 µl de tampón Tris/HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, NaCl 100 mM (pH 7.0) y se transfirieron a eppendorff.

Una vez precipitado el ADN, se procedió a la determinación espectrofotométrica de su concentración. Para ello se preparó una dilución 1:100 con agua bidestilada y se midió su absorbancia a $\lambda = 260$ y 280 nm.

Utilizando una celda de cuarzo de 10 mm, 1 unidad de densidad óptica (OD) equivale aproximadamente a 50 µg/ml de DNA (de doble cadena) ó 40 µg/ml de RNA; por lo que podemos sacar la concentración de DNA mediante la fórmula:

$$C_{DNA} (\mu g / ml) = A_{260} \cdot FD \cdot 50 = A_{260} \cdot 5 \cdot 10^3$$

Determinamos la pureza del DNA extraído mediante la relación A_{260} / A_{280} . Debemos obtener un valor entre 1.7 – 1.9

La digestión del ADN aislado se realizó mediante incubación con 100 unidades de RNA-asa libre de DNA-asa, a 37°C durante 1 hora. La siguiente incubación de la muestra fue con 100 unidades de DNA-asa, a 37°C durante 1 hora más. Posteriormente se le añadieron 15 µl de acetato sódico 0.5 M y 5 unidades de Nucleasa P1 (15 µl del vial comercial resuspendido en 5ml de acetato sódico 0,5 M pH=5), manteniendo una temperatura de 37°C otra hora. Por último, a la muestra obtenida, se le añadieron 100 µl de Tris/HCl 0.4M pH 7.8 y se digirió durante 1 hora a 37°C, con 3 unidades de fosfatasa alcalina (Wei y Frenkel, 1992) [265].

Posteriormente se realizó la inyección en el HPLC.

IV.2.6 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado

La determinación de la concentración de proteínas en una muestra se llevará acabo siguiendo la técnica de Markwell y cols (1978) [266]. Se trata una modificación de la técnica de Lowry y cols (1958), que tiene como objetivo simplificar el procedimiento. La modificación consiste en la adición de dodecilsulfato sódico al reactivo alcalino y en un aumento de la cantidad del reactivo tratado de cobre. Con esta técnica se evita una preincubación de 12 h. con NaOH 1N, que se sustituye por la adición de dodecilsulfato sódico al 1% y en consecuencia, se obtiene una mayor rapidez en la determinación.

La técnica se basa en la formación de un compuesto coloreado al reaccionar el reactivo de Folin-Ciocalteu con los grupos fenólicos e indólicos de los residuos aminoácidos que forman parte de las proteínas.

Dado que la absorbancia varía linealmente con la concentración de proteína para un intervalo de concentración entre 10-100 µg/400µl, se construye una recta patrón con concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) de 0 a 100µg /400µl. La determinación de las muestras problemas se obtiene por interpolación sobre la recta patrón una vez conocida la absorbancia

IV.2.7 Cuantificación del Malondialdehído (MDA)

Para la determinación mediante cromatografía de este producto de peroxidación lipídica se siguió el método descrito por Wong y cols., 1987 [173], basado en la formación del compuesto MDA-TBA₂ que absorbe a 532 nm.

Para iniciar la determinación se tomaron 50 µl de muestra y se le añadieron 500 µl de tampón AcONa 2 M (pH 3.5) TBA 0.2 % y se incubó a 95° C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo la muestra se introdujo en hielo. A continuación se le añadieron 500 µl de tampón KH₂PO₄ 50 mM (pH 6.8) a la muestra y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación se recogieron 200 µl de sobrenadante a los cuales se les añadieron 200 µl de tampón KH₂PO₄ 50 mM (pH 3.5) y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Para el análisis mediante HPLC se emplearon de 200-300 µl del sobrenadante resultante de la centrifugación. Previamente se estudiaron muestras con cantidades de MDA conocidas para extrapolar los resultados a las muestras. Se empleó un detector UV-visible a 532 nm. La columna de cromatografía utilizada fue una columna C-18 Spherisorb de 15 cm de longitud y 5µm de diámetro y un flujo de 1.2 ml/min. Los resultados se expresaron en nmoles/mg proteína.

IV.2.8 Determinación de 8-oxo- dG por HPLC

Las muestras de ADN extraídas se disolvieron en agua de alta pureza para HPLC y se filtraron a través de un filtro 0.2 µm, antes de pasarlas por una columna Waters ODS HPLC (4.6 mm × 250 mm.; tamaño de poro 5 µm) y un flujo de 1 ml/min. La fase móvil está formada por un tampón fosfato potásico 50 mM (pH=5) en un 5% acetonitrilo. El tiempo de retención fue de 7,5 min.

La cantidad de 8-oxo-dG y de dG se cuantificó mediante un detector de absorbancia electroquímico (EC) y de luz ultravioleta (UV), respectivamente (Wei y Frenkel, 1992) [265]. Previamente al análisis de las muestras se analizaron muestras estándar (Sigma) de dG y 8-oxo-dG para asegurar una buena separación cromatográfica de ambas, y permitir la identificación de aquellos derivados del ADN celular (Frenkel y cols., 1991) [267]. Para ello se construyó una curva patrón de regresión lineal ($r = 1$) con los valores volumen-concentración obtenidos.

Los niveles de 8-oxo-dG se expresaron como la relación 8-oxo-dG/10⁶dG.

IV.2.9 Determinación de Glutación oxidado (GSSG)

La determinación del GSSG por HPLC se realizó siguiendo el método de Asensi y cols. (1994) y de Navarro y cols. (1997) [268], [269].

Para la determinación del GSSG primero añadimos 100 μ l de PCA al 6% con N-etilmaleimida (NEM) 20 mM y ácido batofenantrolindisulfónico (BPDS) 1 mM a 100 μ l de células en suspensión. La NEM se utiliza para bloquear el grupo tiol de modo que el GSH no sufra una autooxidación en el proceso y evitemos el aumento de concentración de GSSG por oxidación del GSH durante el procesado de la muestra.

Se centrifugaron las muestras 5 min a 16.000 rpm y 4°C. Se separó el sobrenadante ácido y se conservó en hielo hasta su derivatización. Se añadieron 20 μ l de púrpura de metracresol 0.2 mM a las muestras ajustando el pH a 8.5-9 con KOH 3M y MOPS 0.3 M. La mezcla se centrifugó durante 5 min a 16.000 rpm. A continuación a 50 μ l de muestra se añadieron 100 μ l de fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (FDNB) al 1 %. Se incubó la mezcla durante 45 min en oscuridad y se desecó en vacío.

Se utilizó una columna de Waters ODS S5 NH₂ (0.052, 25cm) con un flujo de 1ml/min. Previamente se estudiaron unos patrones de GSSG para extrapolar los valores de las muestras. El resultado se expresó en nmoles/mg proteína.

IV.2.10 Determinación de Glutación reducido (GSH)

La determinación del glutación reducido se realizó siguiendo el método descrito por Brigelius y cols., 1983 [270] el cual se basa en la formación de un complejo con el Clorodinitrobenzoceno (CDNB), GS-DNB, que puede seguirse espectrofotométricamente. El producto obtenido, 2,4-dinitrofenil-S-glutación presenta un máximo de absorción a 340 nm.

Mantener las muestras en hielo todo el proceso. Aspiramos la placa y añadir 2 ml/pocillo de PBS para lavar. Aspiramos de nuevo y añadimos 200 μ l de ácido perclórico (PCA) 6%-EDTA 1 mM a cada pocillo. Se rasca un pocillo y se pasan las células a un tubo de microcentrífuga. Repetir para cada pocillo. Centrifugar 15 min a 15000g y 4°C.

En la determinación de las muestras se añadió a la mezcla de reacción 800 μ l de fosfato potásico 0.2M, EDTA 1mM (pH 7.0), 100 μ l de la muestra en PCA 6%, 10 μ l CDNB (disuelto en etanol absoluto 2 mg/ml). La formación del producto se observa por la variación de absorbancia a 340nm que se produce al añadir 10 μ l de glutación S-transferasa 500U/ml en tampón fosfato sódico 0.1M, EDTA 1mM (pH 7.4).

Se deja incubar en oscuridad el tiempo necesario para que la reacción tenga efecto (medido previamente).

Para las células 3T3 los resultados se expresaron en nmoles/mg proteína. Para el resto de líneas celulares, se expresan como nmol GSH/10⁶ cél.

La concentración de GSH se calcula con el coeficiente de extinción molar del cromógeno formado que es $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l} \cdot \text{factor dilución} = \frac{A_{340\text{nm},30'} - A_{340\text{nm},0'}}{9,6 \times 1} \times 9,2 \text{ (}\mu\text{mol GSH/ml)} \quad [\text{IV.6}]$$

Donde 9,2 se obtiene del volumen total (800 μl de Kpi + 10 μl CDNB + 100 μl de muestra + 10 μl de GST) dividido entre el volumen de muestra (100 μl).

Para referir la concentración en nmol GSH/ 10^6 cél calculamos los μmoles de GSH (multiplicamos el resultado anterior por el volumen real de muestra obtenido en ml), dividimos este resultado por el n° células totales expresado en millones y multiplicamos por 1000 (para pasar de μmol a nmol).

IV.2.11 Determinación GSSG/GSH

La relación Glutación oxidado y Glutación reducido es un buen marcador de estrés oxidativo, de ahí su empleo en este estudio. La relación resulta del cálculo de: GSSG/GSH \times 100.

IV.2.12 Determinación del glutati3n total

Para la determinaci3n del glutati3n total (GSH + 2 GSSG) se sigui3 el m3todo descrito por Akerboom y Sies, 1981 [271] que consiste en la medici3n espectrofotom3trica de la reducci3n del 3cido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma) por intervenci3n de GSH o GSSG y la GR con NADPH (Roche).

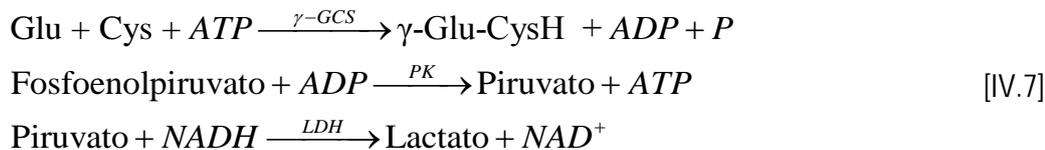
Para ello se prepar3 un cocktail compuesto de 1 ml de tamp3n fosfato pot3sico (Kpi, 0,1M y pH 7) + 20 μl de DTNB (1,5 mg/ml) + 50 μl de NADPH (4mg/ml) + 100 μl de la muestra dilu3da 10 veces en Kpi. Se incub3 a 30°C y se registr3 el blanco a 412 nm. Tras a3adir 10 μl de GR se midi3 la variaci3n de absorci3n.

IV.2.13 Ensayos de actividad enzim3tica: γ -GCS y GS

Las c3lulas fueron resuspendidas y homogeneizadas con tamp3n fosfato 0.1 M a pH 7.2 y 4 °C. Las actividades enzim3ticas de la γ -GCS y de la GS fueron medidas utilizando el m3todo de Seelig y Meister (1985) modificado, como se describe en Lasso de la Vega y cols. (1994) [61], [272].

- La **actividad γ -Glutamilste3ina sintetasa** se determin3 por monitorizaci3n de la velocidad de desaparici3n de NADH a 37°C en una mezcla de reacci3n (1ml de volumen final) que conten3a tamp3n Tris/HCl 200 mM (pH 8.2), KCl 100 mM, ATP 5 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, L-glutamato 10mM, L- α -aminobutirato 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.5 mM, 20 μg de piruvato quinasa y 20 μg de lactato deshidrogenasa.

Se midió la absorbancia a 340 nm. Una unidad de enzima cataliza la formación de 1 nmol de producto por hora a 37°C.



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



IV.2.14 Análisis de células viables y de muerte celular

El porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas se calculó mediante microscopía de fluorescencia, como se describe en Valles y cols. [273]. Para ello, se aislaron células de cada una de las líneas tumorales en estudio y se incubaron con Hoescht 33342 10 mM (tiñe todos los núcleos) e yoduro de propidio 10 mM (tiñe los núcleos de las células con la membrana plasmática dañada) durante 3 minutos.

Se analizaron con un microscopio de fluorescencia Diaphot 300 (Nikon, Tokio, Japón) con excitación a 360 nm, contabilizando unas 1.000 células cada vez. Los núcleos de las células viables se observaron como núcleos enteros azules; las células necróticas se observaron como núcleos enteros rosas. Por su parte, los núcleos fragmentados azules o rosas pertenecían a las células apoptóticas.

IV.2.15 Análisis de la distribución de las fases del ciclo celular

La distribución de las fases del ciclo celular se determinó mediante análisis del contenido de ADN por citometría de flujo, como se describe en Carretero y cols. [255]. Los análisis se realizaron con un citómetro EPICS PROFILE II (Coulter Electronics, Hialeah, Florida) usando un láser de argón ionizado enfriado por aire a 488 nm y 15 mW de potencia para la excitación. Se fijaron las células con etanol al 70% y se añadió yoduro de Propidio 10 μM. Se utilizó dispersión frontal (Forward scatter) y lateral (Side scatter) de la luz, y un filtro de paso de banda de 630 nm (fluorescencia roja). Las muestras fueron adquiridas para 10000 células.

IV.2.16 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa informático GraphPad Prism (versión 5.03).

La hipótesis nula (H_0) establece que no hay diferencias en el crecimiento de las células y/o en los niveles de GSH entre los distintos tratamientos (distintas concentraciones) de polifenoles.

La hipótesis alternativa (H_1) establece que sí hay diferencias en el crecimiento de las células y/o en los niveles de GSH entre los distintos tratamientos (distintas concentraciones) de polifenoles.

Para el análisis estadístico de los resultados, primero se realizó el rechazo de resultados anómalos mediante el test de Grubbs, que compara la desviación entre el valor sospechoso y la media muestral con la desviación estándar de la muestra. Posteriormente, como queremos comparar más de tres series de datos, se realizó el análisis de comparación de varianzas mediante ANOVA de un factor y en caso de rechazarse la hipótesis nula, se utilizó el test de Tukey de múltiples comparaciones, para analizar por pares si hay diferencias significativas entre los grupos.

Para que pueda aplicarse el ANOVA se han de cumplir tres condiciones:

- a) Independencia de los valores obtenidos: cada serie de datos debe ser independiente de las demás.
- b) Normalidad: la distribución interna de cada serie debe ser normal.
- c) Homogeneidad de las varianzas: las varianzas de las series deben ser iguales, es decir, debe ser aceptable $H_0: s_1^2=s_2^2=\dots=s_j^2$. Para comprobarlo utilizaremos el ensayo de homogeneidad de Bartlett.

Para el análisis estadístico de dos grupos de muestras, se utilizó la prueba t de Welch, donde no se asume que las varianzas son iguales para dos muestras independientes.

La simbología empleada en la presente tesis es la siguiente: * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Capítulo V

Resultados experimentales

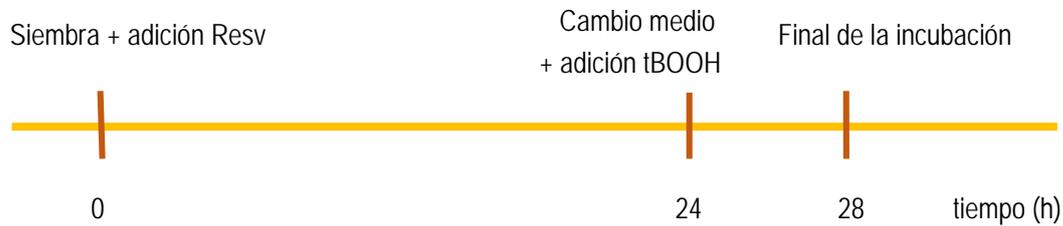
V.1 Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3

Basándonos en los resultados obtenidos en los estudios realizados por el grupo del Dr. Sáez [274], [275] con fibrosarcoma murino y fibroblastos BALB/c3T3, estudiamos el efecto protector del resveratrol frente al daño oxidativo mediante la cuantificación de distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo (8-oxo-dG, MDA, GSH y GSSG).

En primer lugar, sembramos 16 placas y tratamos la mitad con resveratrol durante 20 horas a una concentración fija de 43,82 μM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Transcurrido ese tiempo, añadimos tert-butil hidroperóxido a concentraciones 25, 50 y 100 μM durante 4 horas dejando dos controles y levantamos las células. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron 3 veces.



Posteriormente realizamos un segundo experimento en el que tratamos las células con resveratrol durante 24 horas; transcurrido este tiempo, cambiamos el medio y añadimos tert-butil hidroperóxido a concentraciones 25, 50 y 100 μM durante 4 horas.



Una vez finalizados los experimentos, realizamos la cuantificación de los distintos parámetros de estrés oxidativo. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; · $p < 0.05$, ·· $p < 0.01$, ··· $p < 0.001$)

Tabla V-1 Control: Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3

	8-oxo-dG /10 ⁶ dG	MDA (nmol/mg prot)	GSH (nmol/mg prot)	GSSG (nmol/mg prot)	GSSG/GSH x100
Control	2,94 ± 0,22	0,103 ± 0,010	27,80 ± 2,28	0,240 ± 0,016	0,87 ± 0,11
Resv	2,76 ± 0,41	0,113 ± 0,015	27,40 ± 2,07	0,250 ± 0,027	0,92 ± 0,12
t-BOOH 25 μM	3,75 ± 0,37	0,156** ± 0,011	17,70*** ± 1,58	0,252 ± 0,041	1,42** ± 0,14
t-BOOH 50 μM	4,25** ± 0,55	0,168*** ± 0,022	16,22*** ± 1,51	0,290* ± 0,016	1,80*** ± 0,16
t-BOOH 100 μM	5,62*** ± 0,67	0,276 ± 0,024	14,31*** ± 1,81	0,422*** ± 0,013	2,99*** ± 0,40

^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; · $p < 0.05$, ·· $p < 0.01$, ··· $p < 0.001$

Tabla V-2 Experimento 1 - Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3

	8-oxo-dG /10 ⁶ dG	MDA (nmol/mg prot)	GSH (nmol/mg prot)	GSSG (nmol/mg prot)	GSSG/GSH x100
Resv + t-BOOH 25 μ M	2,84 \pm 0,14	0,116 \pm 0,016	24,00 [^] \pm 3,94	0,214 \pm 0,011	0,91 ^{^^} \pm 0,12
Resv + t-BOOH 50 μ M	3,22 ⁺ \pm 0,43	0,136 \pm 0,023	21,00 ^{**} \pm 1,75	0,222 ⁺⁺⁺ \pm 0,019	1,06 ⁺⁺⁺ \pm 0,04
Resv + t-BOOH 100 μ M	3,87 ⁻⁻⁻ \pm 0,68	0,194 ^{****+} \pm 0,021	20,80 ^{**} - \pm 3,25	0,294 ^{*---} \pm 0,023	1,44 ^{****-} \pm 0,22

[^]p<0.05, ^{^^}p<0.01, ^{^^^}p<0.001; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, --p<0.01, ---p<0.001

Tabla V-3 Experimento 2 - Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3

	8-oxo-dG /10 ⁶ dG	MDA (nmol/mg prot)	GSH (nmol/mg prot)	GSSG (nmol/mg prot)	GSSG/GSH x100
Resv + t-BOOH 25 μ M	2,88 \pm 0,15	0,128 \pm 0,013	26,00 ^{^^^} \pm 3,94	0,210 \pm 0,013	0,87 ^{^^} \pm 0,14
Resv + t-BOOH 50 μ M	3,09 ⁺ \pm 0,39	0,152 ^{**} \pm 0,028	23,20 ⁺⁺ \pm 1,92	0,232 ⁺⁺ \pm 0,019	1,00 ⁺⁺⁺ \pm 0,11
Resv + t-BOOH 100 μ M	4,19 ^{**---} \pm 0,63	0,220 ^{****+} \pm 0,016	23,60 ⁻⁻⁻ \pm 3,13	0,316 ^{***-} \pm 0,023	1,36 ^{****-} \pm 0,19

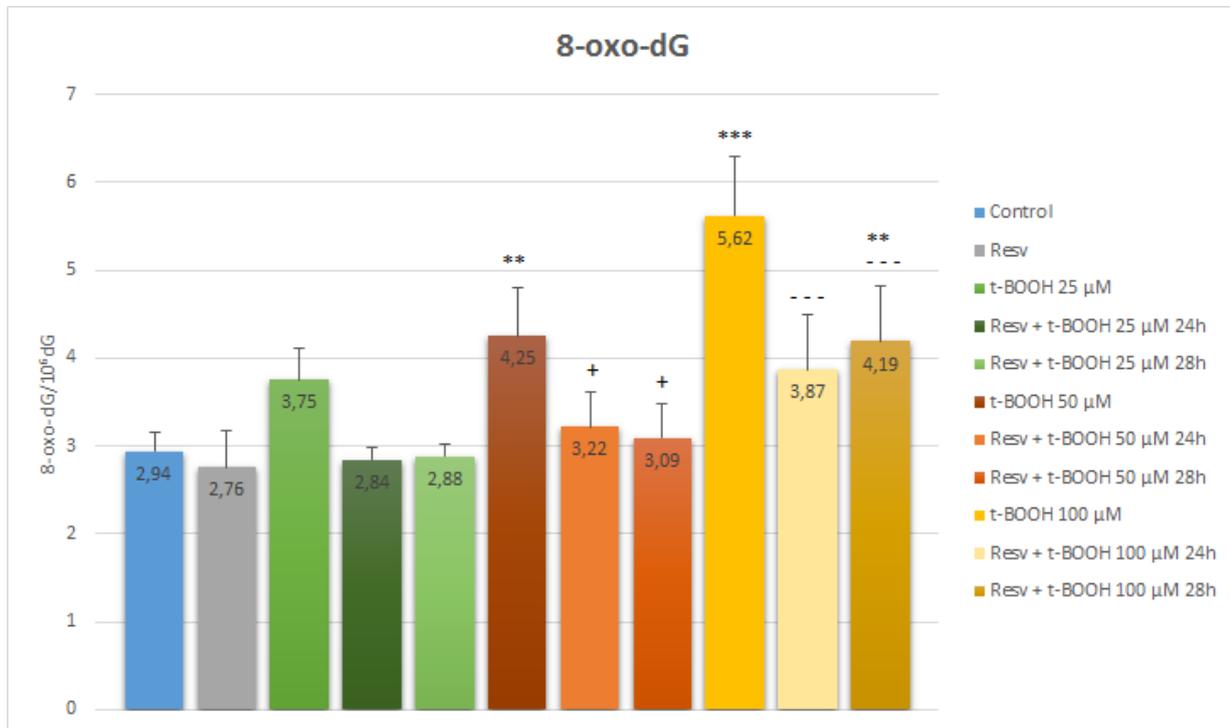
[^]p<0.05, ^{^^}p<0.01, ^{^^^}p<0.001; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, --p<0.01, ---p<0.001

V.1.1 8-oxo-dG

Obtenemos un valor de $F=17.80$ ($p<0.001$), lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $F=17.20$ y $p = 0.07$, por lo que las varianzas no difieren de forma estadísticamente significativa. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones de tBOOH 50 μM , tBOOH 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 28 horas (** $p<0.01$, *** $p<0.001$). De esto deducimos que la incubación con el agente oxidante en presencia del resveratrol protege en mayor medida a las células del daño al ADN que realizando la incubación con el oxidante tras una pre-incubación con resveratrol y cambiando el medio, especialmente a concentraciones de 100 μM . Esta concentración es más relevante a nivel fisiopatológico porque es aproximadamente la concentración de H_2O_2 presente en el primer ambiente metastásico durante la interacción del endotelio vascular con la célula metastásica, interacción que se produce durante un período de 4 a 6 horas.

También obtenemos diferencias significativas entre el grupo de tBOOH 50 μM y resveratrol + tBOOH 50 μM tanto a las 24 como a las 28 horas (+ $p<0.05$) así como entre el grupo de tBOOH 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas (--- $p<0.001$).

Por último, si comparamos los resultados obtenidos en los dos experimentos, comprobamos que los niveles de 8-oxo-dG son muy similares, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre añadir el oxidante directamente o cambiar primero el medio de cultivo.



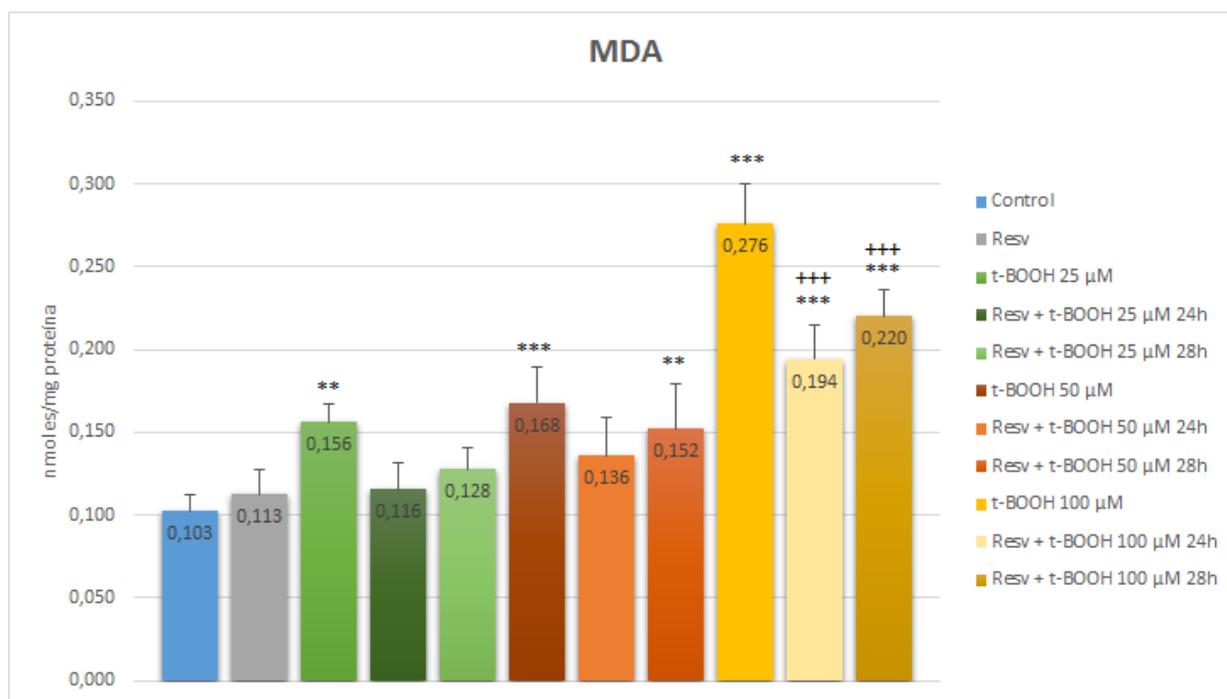
Gráfica V-I Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de 8-oxo-dG

V.1.2 MDA

Obtenemos un valor de $F=38.73$ ($p<0.001$), lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $F=7.56$ y $p = 0.67$, por lo que las varianzas no difieren de forma estadísticamente significativa. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones tBOOH 25, 50 y 100 μM , resveratrol + tBOOH 50 μM a las 28 horas y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas ($**p<0.01$, $***p<0.001$). Podemos observar que al eliminar el resveratrol del medio de cultivo, desaparece parte de su efecto protector, produciéndose una mayor oxidación lipídica en el segundo experimento.

Por otra parte, obtenemos diferencias significativas entre el grupo de tBOOH 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas ($-p<0.01$, $---p<0.001$).

Por último, si comparamos los resultados obtenidos en los dos experimentos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de concentraciones.



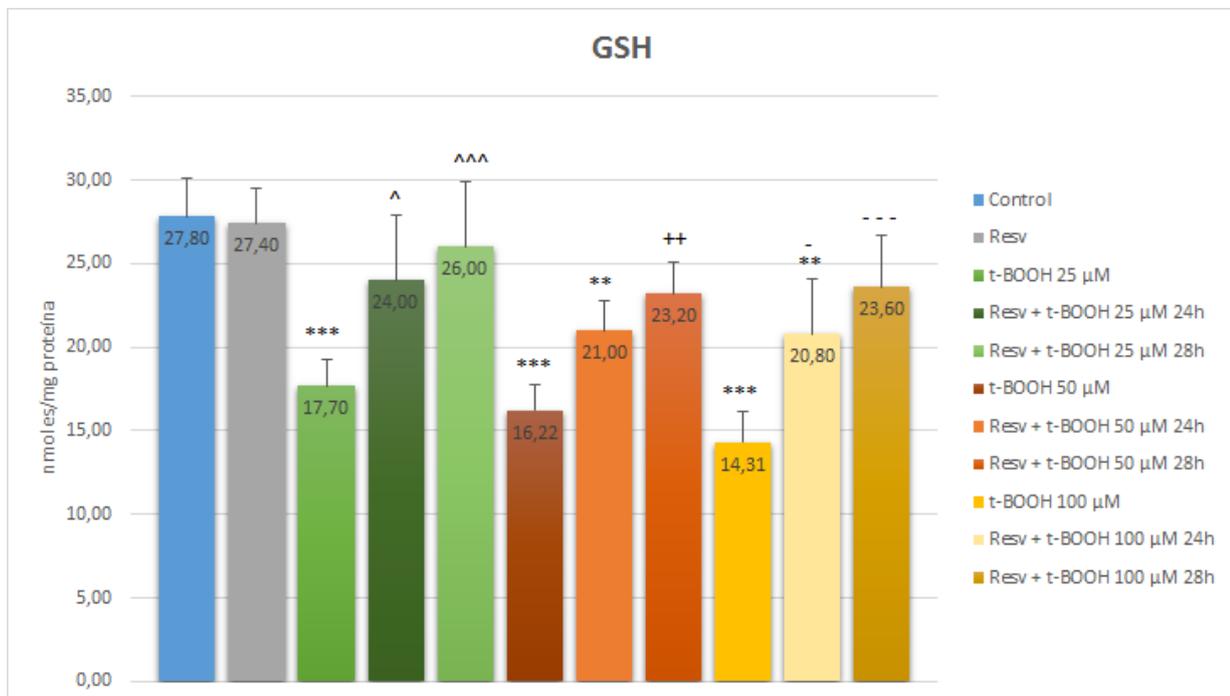
Gráfica V-II Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de MDA

V.1.3 GSH

Obtenemos un valor de $F=14.55$ ($p<0.001$), lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $F=9.67$ y $p = 0.47$, por lo que las varianzas no difieren de forma estadísticamente significativa. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones de tBOOH 25 μM , 50 μM y 100 μM , resveratrol + tBOOH 50 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 horas ($**p<0.01$, $***p<0.001$). Vemos como al añadir el t-BOOH se produce una disminución / depleción del GSH, que se oxida a GSSG.

También obtenemos diferencias significativas entre tBOOH 25 μM y resveratrol + tBOOH 25 μM tanto a las 24 como a las 28 horas ($^{\wedge}p<0.05$, $^{\wedge\wedge}p<0.01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p<0.001$); el grupo de tBOOH 50 μM y resveratrol + tBOOH 50 μM a las 28 horas ($^{++}p<0.01$) y entre el grupo de tBOOH 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas ($^{-}p<0.05$, $^{---}p<0.001$). En presencia de resveratrol se observa el efecto antioxidante del mismo, puesto que se produce una menor disminución en los niveles de GSH. En la tabla podemos observar como el efecto protector aumenta al prolongar la exposición de las células al antioxidante.

Por último, si comparamos los resultados obtenidos en los dos experimentos, no existen diferencias estadísticamente significativas entre añadir el oxidante directamente o cambiar primero el medio de cultivo.



Gráfica V-III Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de GSH

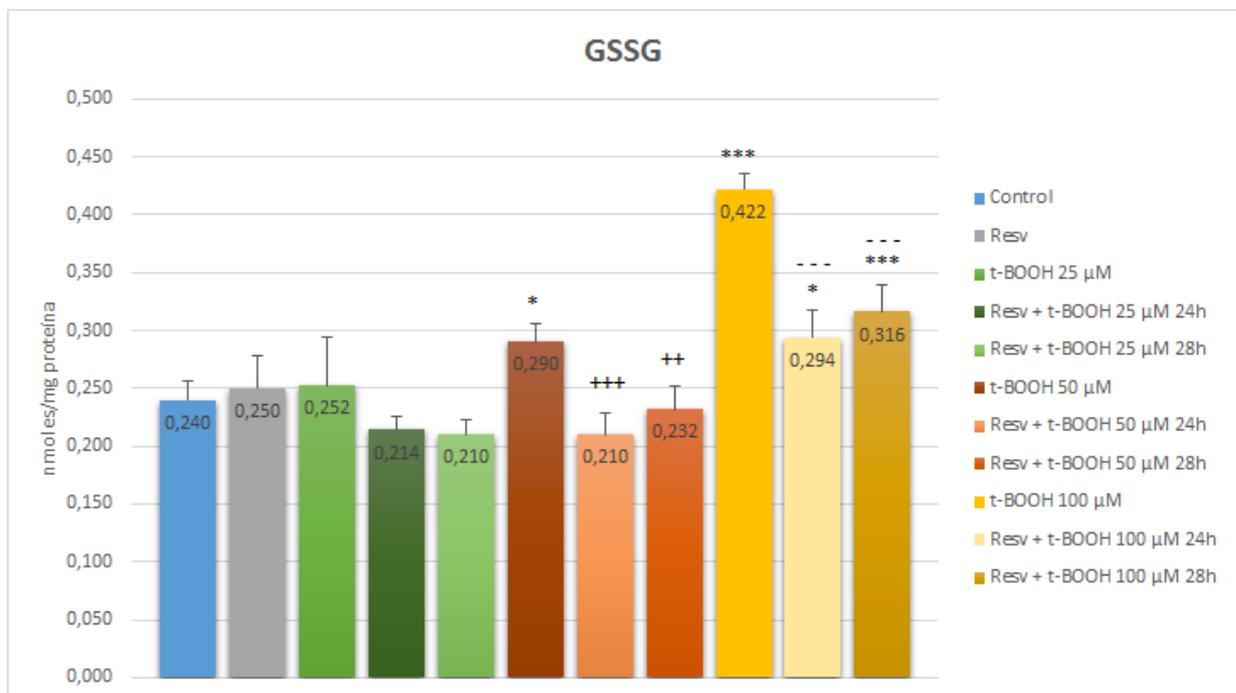
V.1.4 GSSG

Obtenemos un valor de $F=38.82$ ($p<0.001$), lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $F=11.74$ y $p = 0.30$, por lo que las varianzas no difieren de forma estadísticamente significativa. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones de tBOOH 50 μM , tBOOH 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$).

Podemos observar como en presencia del oxidante los niveles de GSSG aumentan como consecuencia de la oxidación del GSH descrita anteriormente. Por otra parte, la pre-incubación con resveratrol actúa impidiendo la oxidación, obteniendo niveles de GSSG inferiores al grupo control, salvo en los experimentos en los que empleamos tBOOH 100 μM .

Para concentraciones de tBOOH de 50 μM y 100 μM , obtenemos diferencias significativas tanto a las 24 como a las 28 horas ($**p<0.01$, $***p<0.001$ y $----p<0.001$).

Por último, si comparamos los resultados obtenidos en los dos experimentos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre añadir el oxidante directamente o cambiar primero el medio de cultivo.



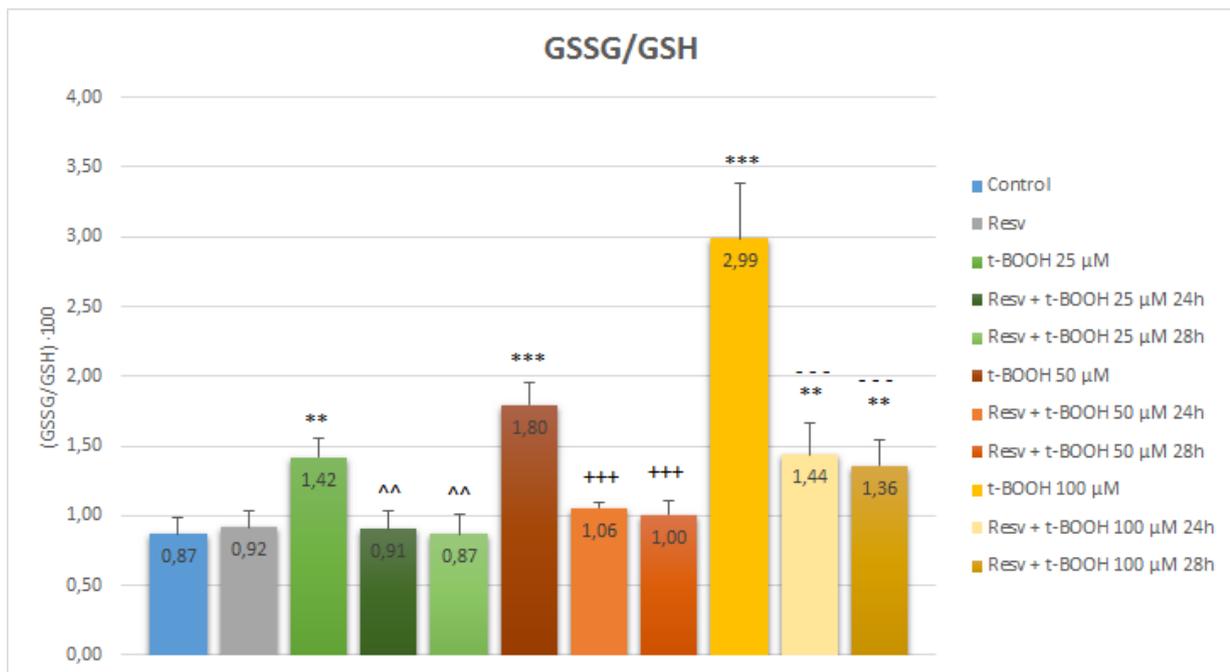
Gráfica V-IV Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre niveles de GSSG

V.1.5 GSSG/GSH

Obtenemos un valor de $F=54.17$ ($p<0.001$), lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $F=23.06$ y $p = 0.011$, por lo que las varianzas no difieren de forma estadísticamente significativa. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones de tBOOH 25 μM , 50 μM , 100 μM y resveratrol + tBOOH 100 μM a las 24 y a las 28 horas ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$).

Podemos observar como en presencia del oxidante la relación GSSG/GSH aumenta puesto que, como ya hemos comentado, parte del GSH se ve oxidado a GSSG. Por otra parte, la pre-incubación con resveratrol actúa impidiendo la oxidación, por lo que conseguimos que la relación se mantenga, salvo a concentraciones de tBOOH 100 μM .

Por último, al comparar los resultados obtenidos en los dos experimentos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre añadir el oxidante directamente o cambiar primero el medio de cultivo.



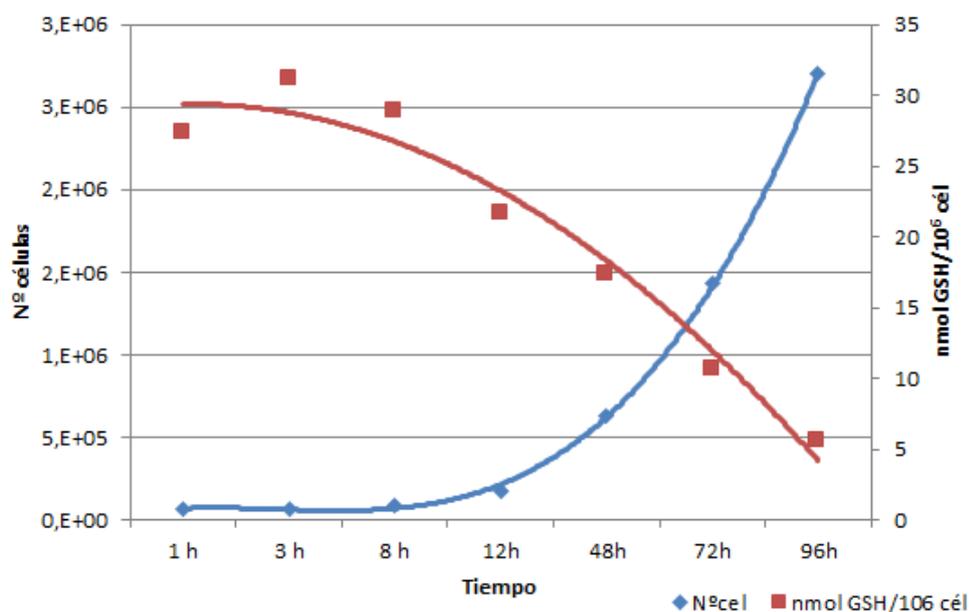
Gráfica V-V Efecto del Resv incubado en presencia del t-BOOH sobre la relación GSSG/GSH

V.2 Curvas de crecimiento, tiempo de doblaje y niveles de GSH

Tal y como se ha explicado en el apartado de material y métodos, para obtener los PDT se realizaron curvas de crecimiento de cada una de las líneas celulares recogiendo y contando las células a las 24, 48, 72 y 96 horas. Cada punto se realizó por triplicado y se promediaron los valores.

Como podemos observar, todas las líneas tumorales siguen un patrón de crecimiento *in vitro* exponencial; mientras que los niveles de GSH intracelular parecen seguir un patrón similar, pero opuesto. A medida que aumenta la densidad celular, disminuye la concentración de GSH intracelular, sin que la concentración de GSSG se vea afectada. Estos dos fenómenos ya conocidos, están relacionados con una disminución en la actividad γ -GCS y en la captación de cisteína por las células confluentes, lo que conlleva una disminución en la síntesis de GSH para un eflujo constante.

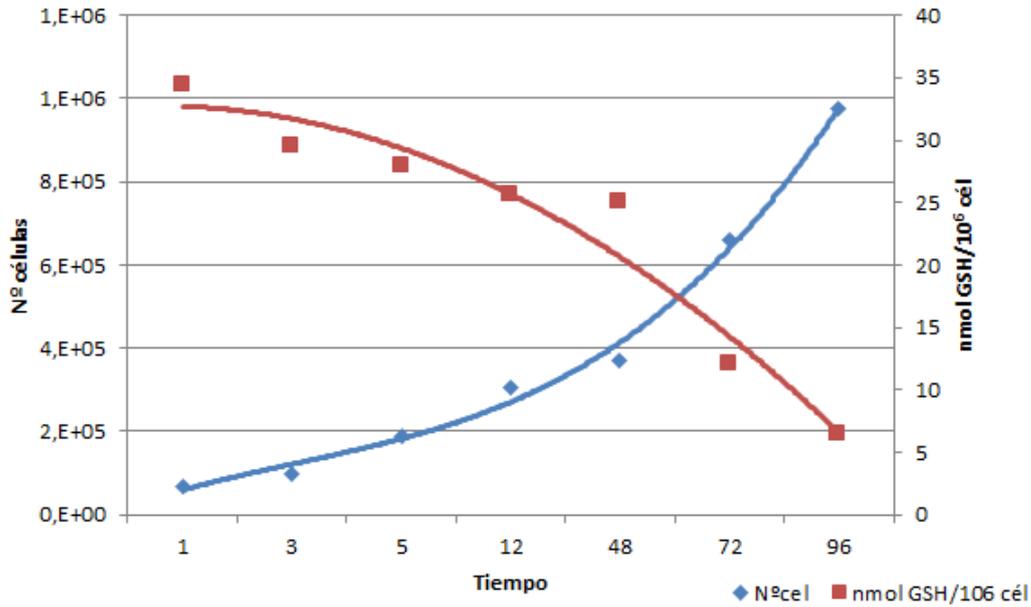
V.2.1 Melanoma (A-375)



Gráfica V-VI Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células A-375

El tiempo de doblaje (PDT) es de aproximadamente 20 horas.

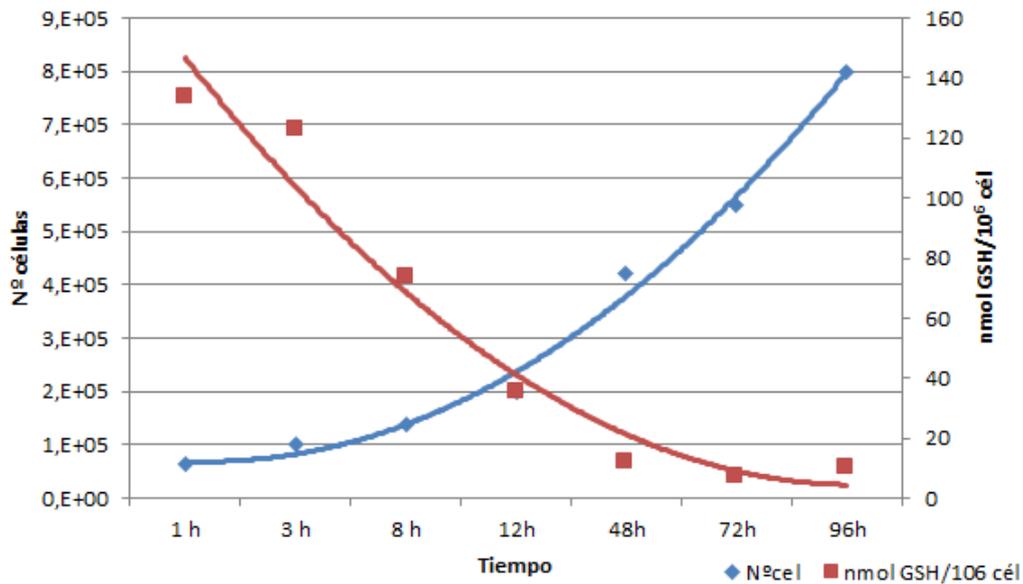
V.2.2 Pulmón (A-549)



Gráfica V-VII Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células A-549

El tiempo de doblaje (PDT) es de aproximadamente 33 horas.

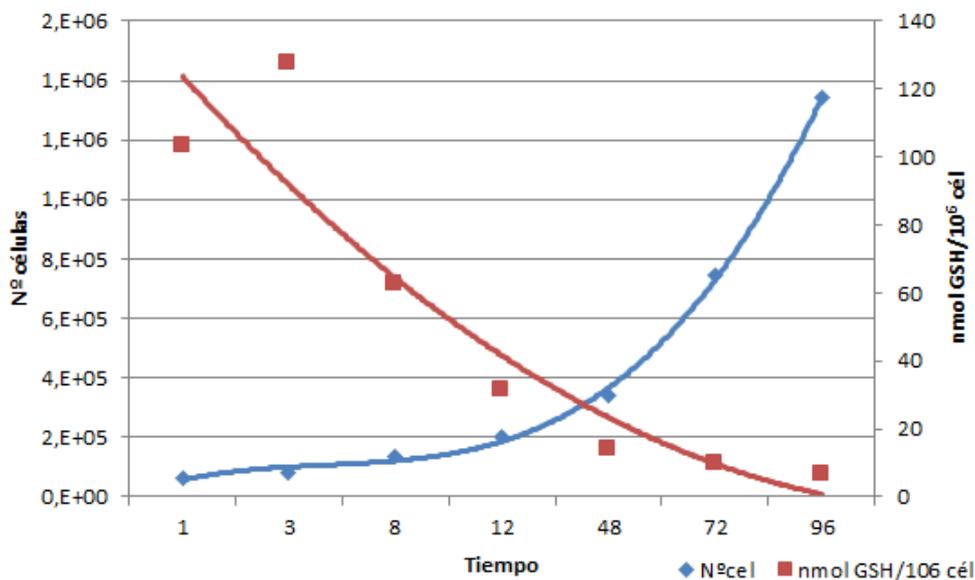
V.2.3 Mama (MCF-7)



Gráfica V-VIII Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células MCF-7

El tiempo de doblaje (PDT) es de aproximadamente 35 horas.

V.2.4 Colon (HT-29)

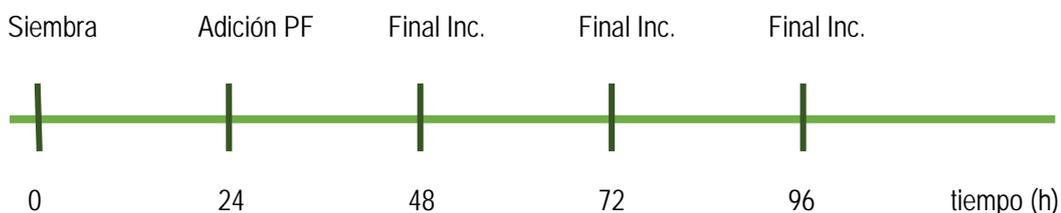


Gráfica V-IX Curva de crecimiento y niveles de GSH para las células HT-29

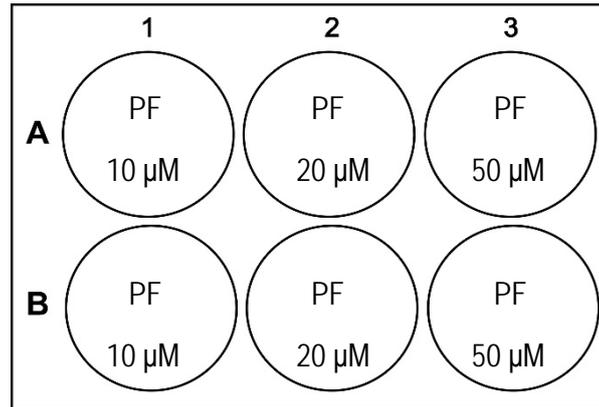
El tiempo de doblaje (PDT) es de aproximadamente 26 horas.

V.3 Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento in vitro de las células

Basándonos en los resultados obtenidos en estudios anteriores por el equipo del Dr. Estrela sobre el glutatión y su papel en la biología del cáncer y en la muerte celular, decidimos estudiar el efecto del resveratrol, el pterostilbeno y la quercetina sobre las líneas tumorales descritas anteriormente. Para ello, se sembraron $2 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos, a las 24 horas se realizó la adición de los polifenoles (PF) (*) y se recogieron, contaron y determinaron los niveles de GSH de las células a las 48, 72 y 96 horas post-siembra (Final de la incubación). Cada experimento se realizó por cuadruplicado y se repitió 2 veces.



(*)Transcurridas 24 horas para que todas las células estén adheridas, añadimos separadamente cada uno de los polifenoles a concentraciones de 5, 10, 20 y 50 μM , además de realizar un control sólo con células y un control adicionando DMSO. Podemos verlo en el siguiente ejemplo:



V.3.1 Melanoma (A-375)

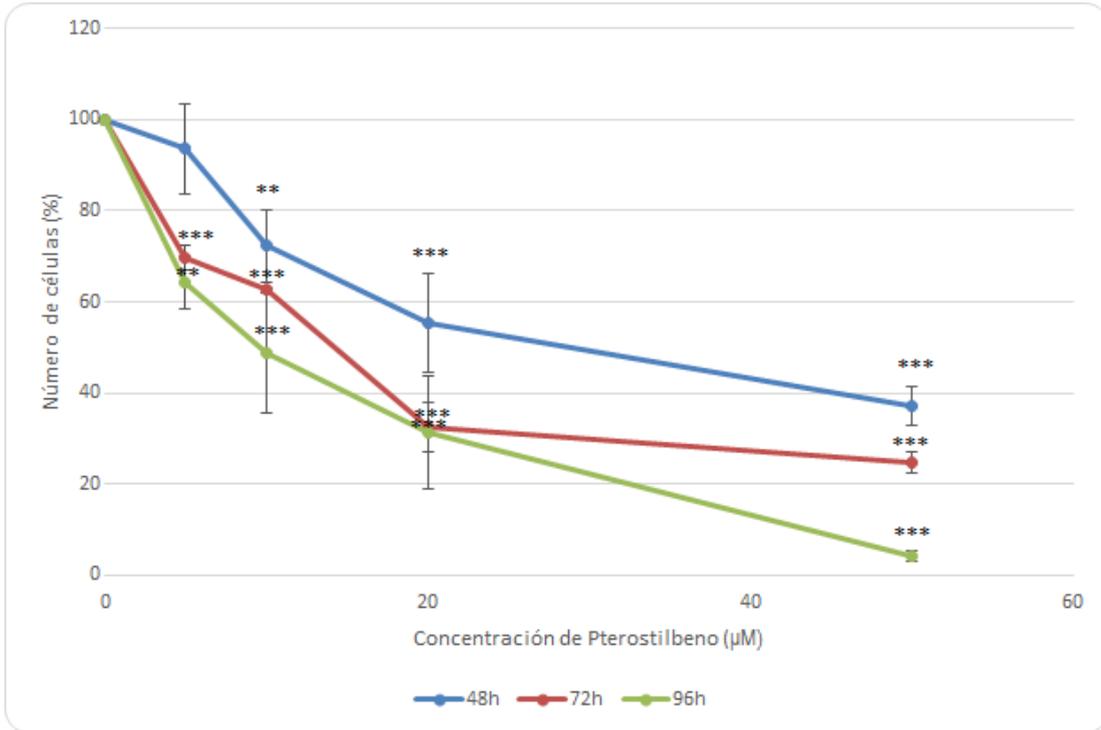
En el caso de las células A-375, vemos que los tres polifenoles estudiados son capaces de disminuir su crecimiento, de modo que a mayor concentración de polifenol y mayor tiempo transcurrido, menor es el número de células vivas presentes en cultivo. Transcurridas 96 horas desde la siembra, a concentración 50 µM el número de células tumorales es casi inexistente ($\leq 6\%$).

En cuanto a la estadística, para los tres polifenoles obtenemos un valor de $p < 0.001$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula.

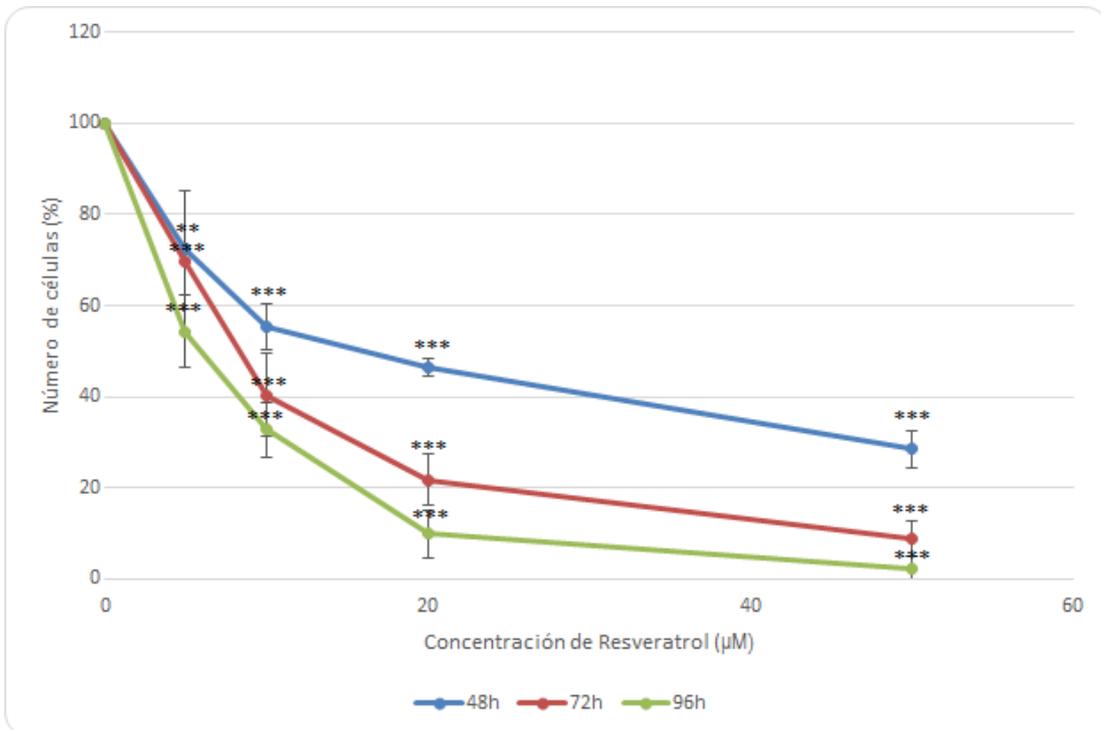
Para el pterostilbeno, con el test de múltiples comparaciones de Tukey obtenemos diferencias significativas a 48 horas en la comparación entre el grupo control y las distintas condiciones salvo 5 µM ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$), mientras que a 72 y 96 horas obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las distintas concentraciones de polifenol ($***p < 0.001$).

Por su parte, el resveratrol muestra diferencias significativas con $***p < 0.001$ en todas las condiciones comparadas con el control salvo 5 µM ($**p < 0.01$) a las 48 horas de incubación.

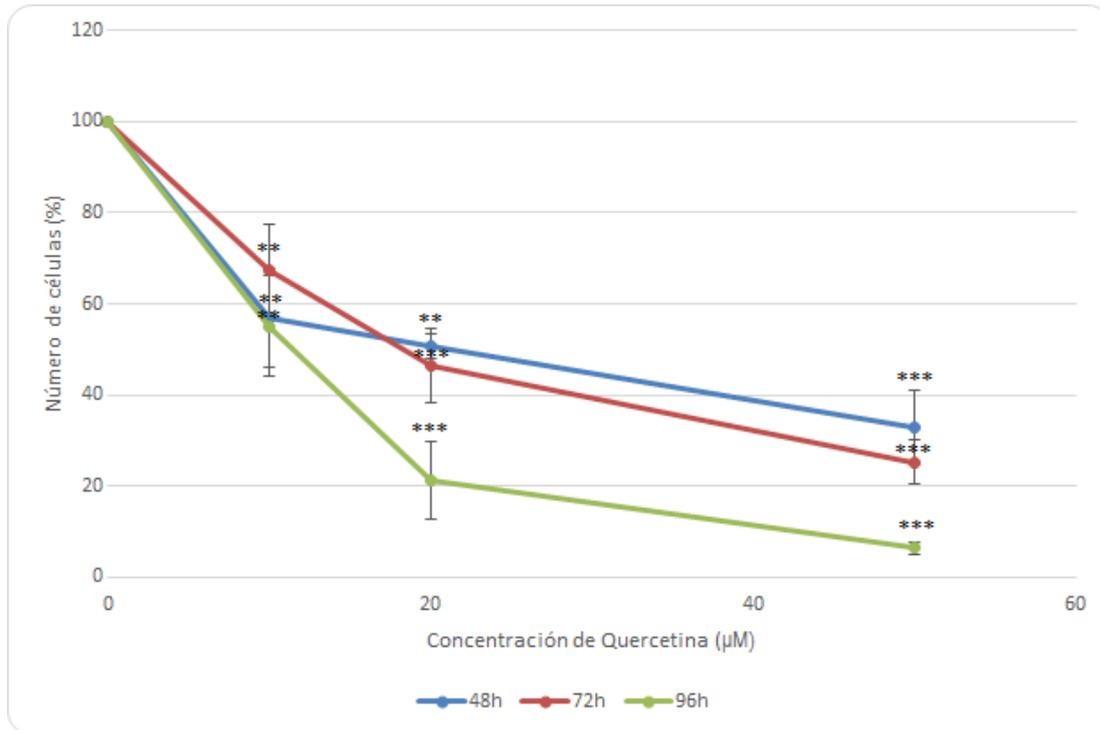
Para la quercetina, en cambio, encontramos diferencias significativas con $**p < 0.01$ en las condiciones 10 µM a 48, 72 y 96 horas y 20 µM a 48 horas en comparación con el control, mientras que el resto de condiciones presentan diferencias significativas con $***p < 0.001$ respecto al control.



Gráfica V-X Efecto del pterostilbena sobre el crecimiento de A-375



Gráfica V-XI Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de A-375



Gráfica V-XII Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de A-375

V.3.2 Pulmón (A-549)

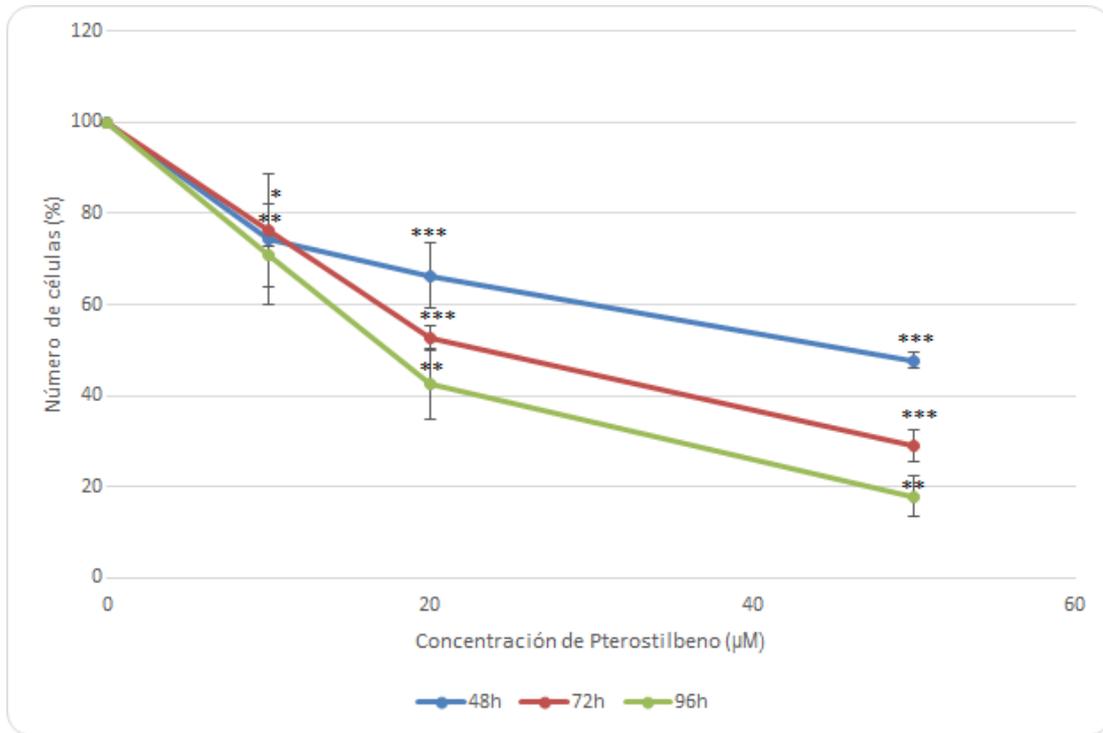
En el caso de las células A-549, observamos que los tres polifenoles estudiados son capaces de disminuir el número de células en cultivo aunque el pterostilbeno sigue una tendencia de disminución más progresiva. La disminución en el número de células vivas es mayor a mayor concentración de polifenol y mayor tiempo transcurrido. Como podemos observar en las tres gráficas siguientes, transcurridas 96 horas desde la siembra, a concentración 50 µM el número de células tumorales presentes en cultivo se encuentra en torno al 25%.

En cuanto a la estadística, para los tres polifenoles obtenemos un valor de $p < 0.001$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula.

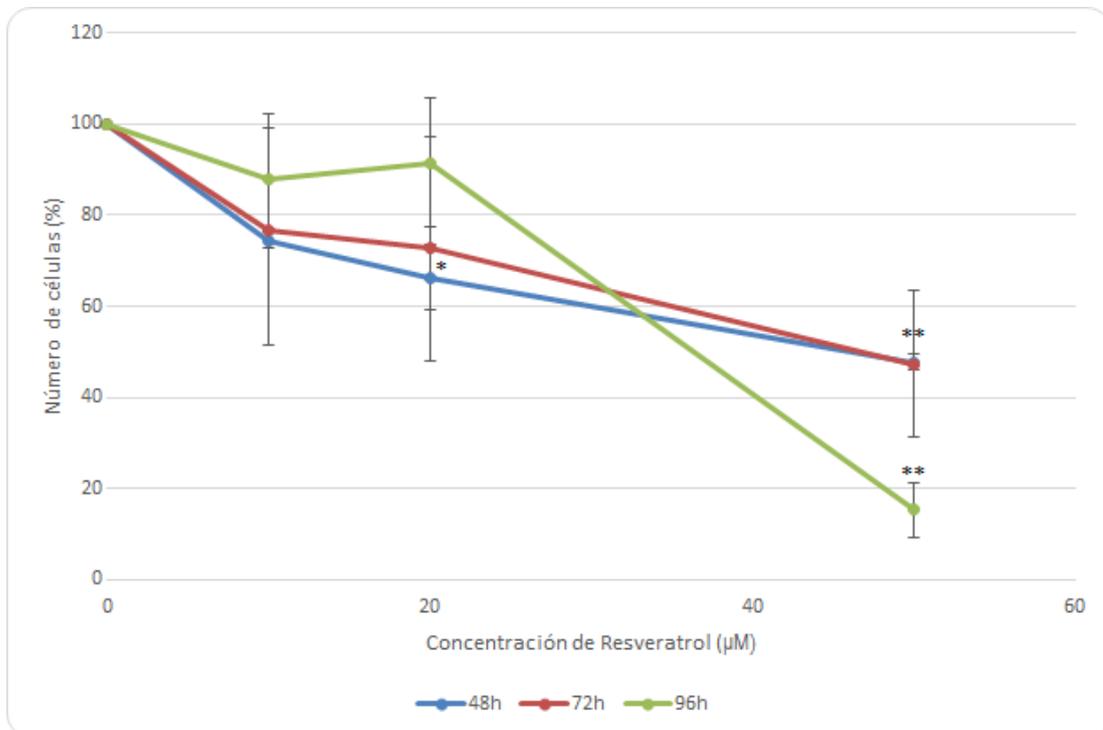
Para el pterostilbeno, con el test de múltiples comparaciones de Tukey obtenemos diferencias significativas a 48 horas en la comparación entre el grupo control y las distintas condiciones ($**p < 0.01$ para 10 µM y $***p < 0.001$ para 20 y 50 µM), a 72 horas obtenemos diferencias significativas con $*p < 0.05$ para 10 µM y $***p < 0.001$ para 20 y 50 µM, mientras que a 96 horas obtenemos diferencias significativas sólo a concentraciones de 20 y 50 µM con $**p < 0.01$.

Por su parte, el resveratrol muestra diferencias significativas con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ a 48 horas en 20 y 50 µM respectivamente, comparadas con el control; no muestra diferencias significativas a 72 horas. A 96 horas sólo hay diferencias significativas ($**p < 0.01$) entre resveratrol 50 µM y el grupo control, como puede apreciarse en la gráfica correspondiente.

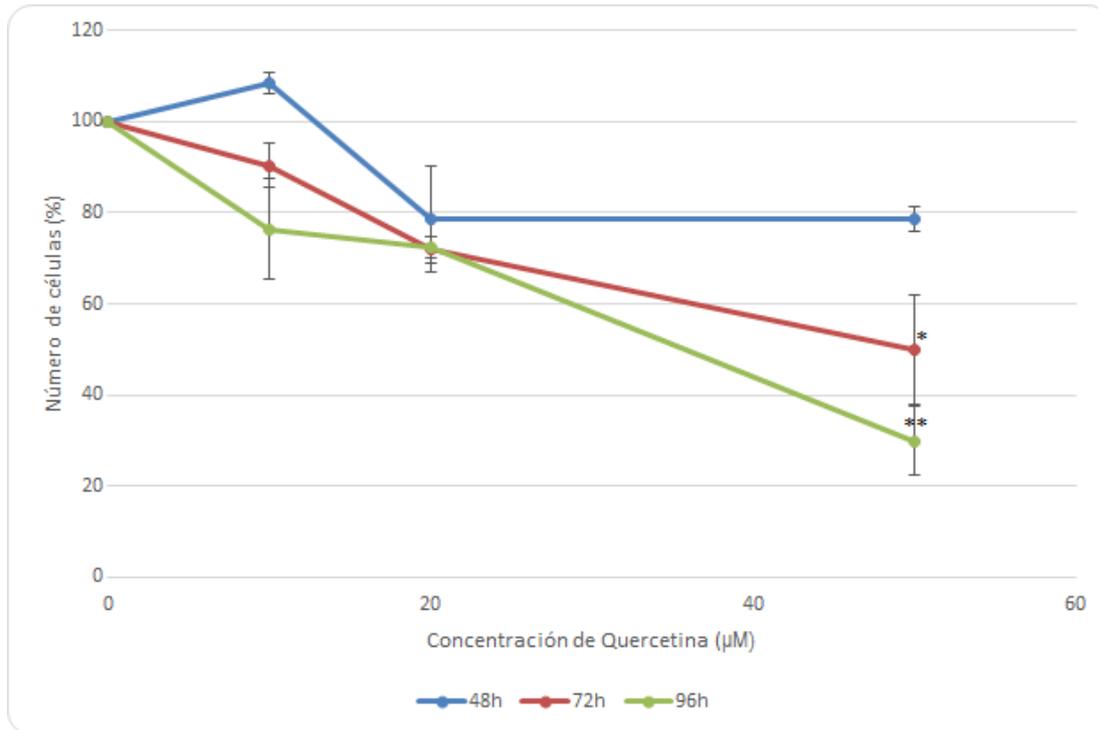
Para la quercetina, en cambio, no encontramos diferencias significativas con el grupo control a excepción de la concentración 50 μM a 72 y 96 horas con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ respectivamente.



Gráfica V-XIII Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de A-549



Gráfica V-XIV Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de A-549



Gráfica V-XV Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de A-549

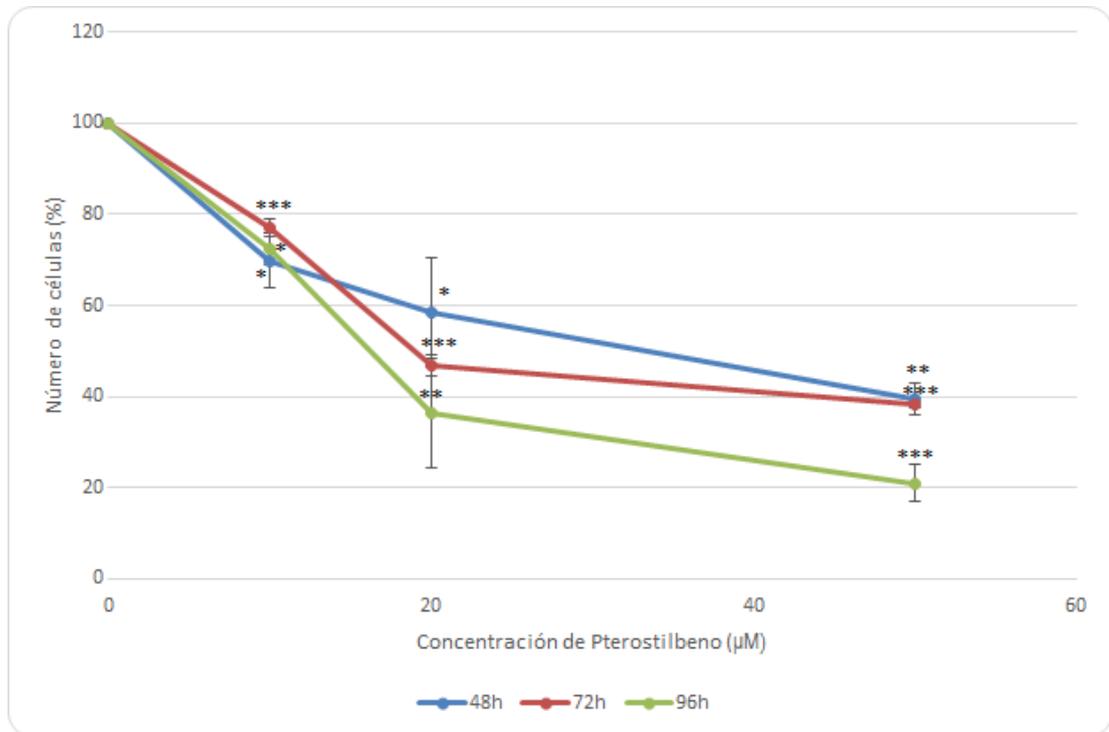
V.3.3 Mama (MCF-7)

Al igual que en los casos anteriores, para las células MCF-7, también observamos que los tres polifenoles estudiados son capaces de disminuir el número de células en cultivo aunque el pterostilbeno continúa con una tendencia de disminución más progresiva. La disminución en el número de células vivas es mayor cuanto mayor es la concentración de polifenol añadida y mayor es el tiempo transcurrido. Como podemos observar en las tres gráficas siguientes, transcurridas 96 horas desde la siembra, a concentración 50 µM el número de células tumorales presentes en cultivo varía mucho dependiendo del polifenol, en el caso del pterostilbeno se corresponde a un 21%, seguido por la quercetina que presenta un 32% de células vivas en cultivo. En el caso del resveratrol, observamos sólo una disminución celular del 50%.

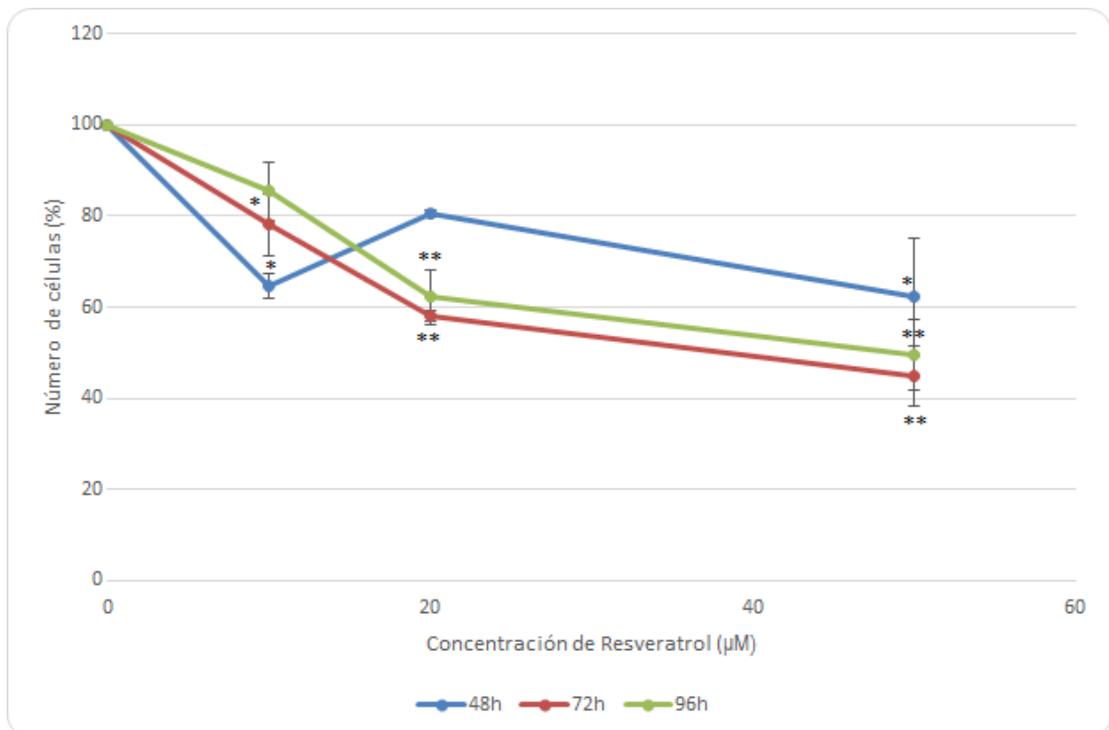
En lo referente a la estadística, para el pterostilbeno obtenemos diferencias significativas entre el grupo control y las distintas condiciones. A 48 horas muestra diferencias con $*p < 0.05$ para concentraciones de 10 y 20 µM y $**p < 0.01$ para 50 µM. Por otra parte, a 72 horas obtenemos diferencias significativas con $***p < 0.001$ para todas las concentraciones. En cambio, a 96 horas obtenemos diferencias significativas con $*p < 0.05$ para 10 µM, $**p < 0.01$ para 20 µM y $***p < 0.001$ para 50 µM.

Por su parte, el resveratrol muestra diferencias significativas con $*p < 0.05$ a 48 horas para 10 y 50 µM. A 72 horas muestra diferencias significativas en todas las concentraciones, con $*p < 0.05$ para 10 µM y $**p < 0.01$ para 20 y 50 µM; mientras que a 96 horas sólo hay diferencias significativas ($**p < 0.01$) entre resveratrol 20 y 50 µM y el grupo control.

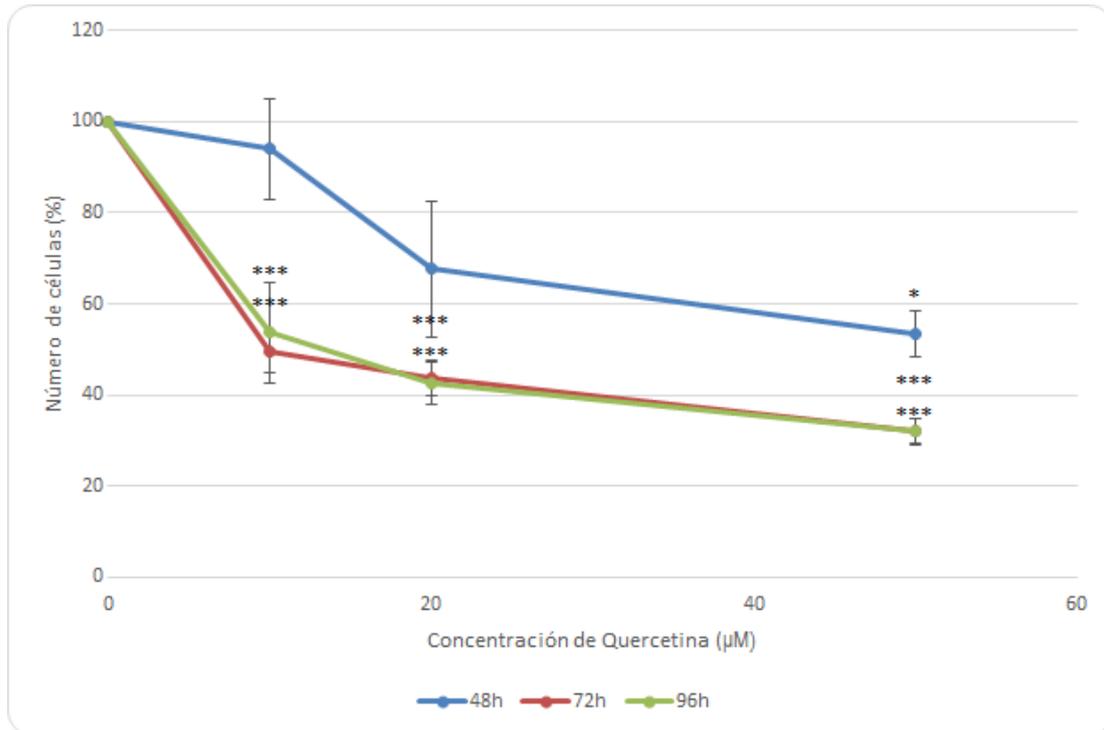
Para la quercetina, encontramos diferencias significativas con el grupo control a 48 horas a la concentración de 50 μM ($*p<0.05$) y a 72 y 96 horas para todas las concentraciones de polifenol ($***p<0.001$).



Gráfica V-XVI Efecto del pterostilbeno sobre el crecimiento de MCF-7



Gráfica V-XVII Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de MCF-7



Gráfica V-XVIII Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de MCF-7

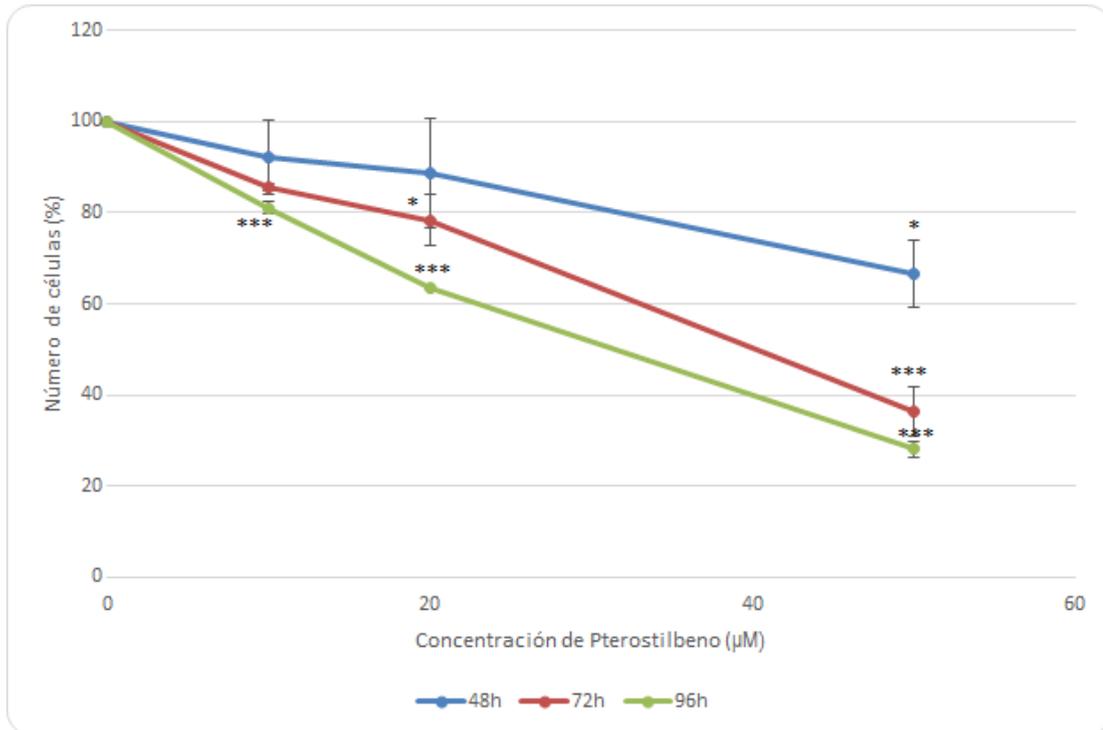
V.3.4 Colon (HT-29)

Por último, en las células HT-29, observamos que aunque los tres polifenoles estudiados son capaces de disminuir el número de células en cultivo, el pterostilbeno es el único que sigue una tendencia de disminución progresiva, presentando un 28% de células vivas en cultivo a concentración 50 µM y transcurridas 96 horas desde la siembra. En el caso de la quercetina, continúan vivas el 34% de las células y en el caso del resveratrol, el 56% de la población celular.

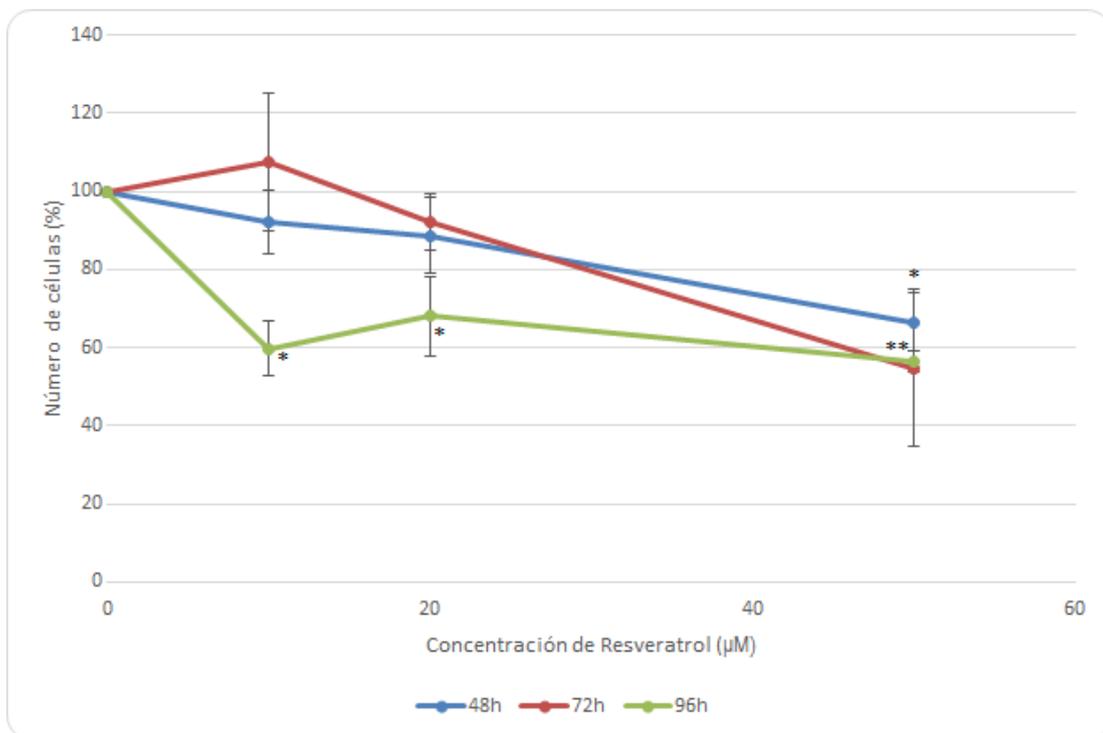
En cuanto a la estadística, el pterostilbeno a 48 horas muestra diferencias significativas con el grupo control a concentración 50 µM (* $p < 0.05$); a 72 horas encontramos diferencias a concentraciones de 20 µM (* $p < 0.05$) y 50 µM (** $p < 0.001$), mientras que 96 horas encontramos diferencias significativas a todas las concentraciones con una *** $p < 0.001$.

En el caso del resveratrol, encontramos diferencias significativas con el grupo control a las 48 horas únicamente a la concentración de 50 µM con * $p < 0.05$ y a las 96 horas con * $p < 0.05$ para concentraciones de resveratrol de 10 µM y con ** $p < 0.01$ para concentraciones de 20 y 50 µM.

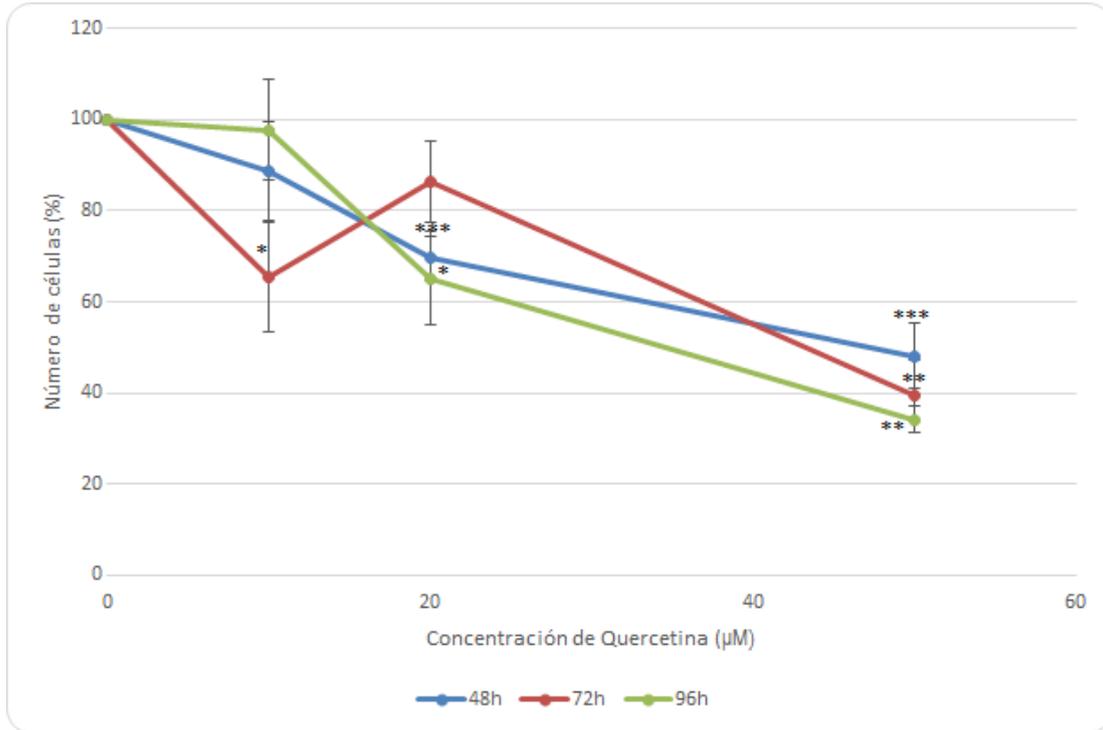
Para la quercetina, encontramos diferencias significativas con el grupo control a 48 horas a las concentraciones de 20 y 50 µM (** $p < 0.001$), a 72 horas para las concentraciones de 10 y 50 µM (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respectivamente) y a 96 horas para las concentraciones de 20 y 50 µM (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respectivamente).



Gráfica V-XIX Efecto del pterostilbene sobre el crecimiento de HT-29



Gráfica V-XX Efecto del resveratrol sobre el crecimiento de HT-29



Gráfica V-XXI Efecto de la quercetina sobre el crecimiento de HT-29

V.4 Análisis de muerte celular y de la distribución de las fases del ciclo celular

Como ya se ha descrito en el apartado de material y métodos, el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas se calculó mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se sembraron las células tumorales y pasadas 24 horas, fueron tratadas con resveratrol o pterostilbino a concentraciones de 20 μ M durante 48 horas más. A las 72 horas post-siembra, se realizó el análisis por microscopía. Cada experimento se realizó por cuadruplicado o quintuplicado.

Tabla V-4 Análisis de muerte celular

	% células viables			% células apoptóticas			% células necróticas		
	Control	Resv	Pter	Control	Resv	Pter	Control	Resv	Pter
A-375	96 \pm 3	53** \pm 6	57** \pm 4	36 \pm 6	67** \pm 9	74** \pm 11	64 \pm 4	33** \pm 6	26** \pm 5
A-549	97 \pm 5	62** \pm 8	70 \pm 12	42 \pm 10	54 \pm 8	68** \pm 10	58 \pm 9	46 \pm 4	32** \pm 3
MCF-7	97 \pm 4	67** \pm 10	61** \pm 7	24 \pm 5	48** \pm 8	53** \pm 4	76 \pm 9	52 \pm 6	47** \pm 7
HT-29	98 \pm 4	91 \pm 6	90 \pm 6	31 \pm 7	26 \pm 5	24 \pm 7	69 \pm 10	74 \pm 4	76 \pm 5

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

El % de células viables está calculado sobre el número total de células contadas. El % de células necróticas y apoptóticas está calculado sobre el número total de células no viables.

Tabla V-5 Distribución de las fases del ciclo celular

	Control			Resveratrol			Pterostilbino		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
A-375	58 \pm 6	23 \pm 4	19 \pm 5	68 \pm 7	16 \pm 4	16 \pm 2	74** \pm 6	11** \pm 3	15 \pm 1
A-549	65 \pm 5	20 \pm 3	15 \pm 2	73 \pm 8	11** \pm 5	16 \pm 4	79** \pm 7	9** \pm 2	12 \pm 3

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

V.5 Efecto de los polifenoles sobre los niveles de GSH

Realizamos un ANOVA de un factor para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de GSH para cada uno de los tratamientos (distintas concentraciones) con polifenoles.

V.5.1 Melanoma (A-375)

V.5.1.1 48 horas post-siembra

Para el pterostilbeno, obtenemos un valor de $F=16.55$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.01$ y $F=15.17$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las distintas condiciones salvo $5 \mu\text{M}$ ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$), así como entre el grupo de pterostilbeno $5 \mu\text{M}$ y el resto de concentraciones ($+p<0.05$, $++p<0.01$, $+++p<0.001$).

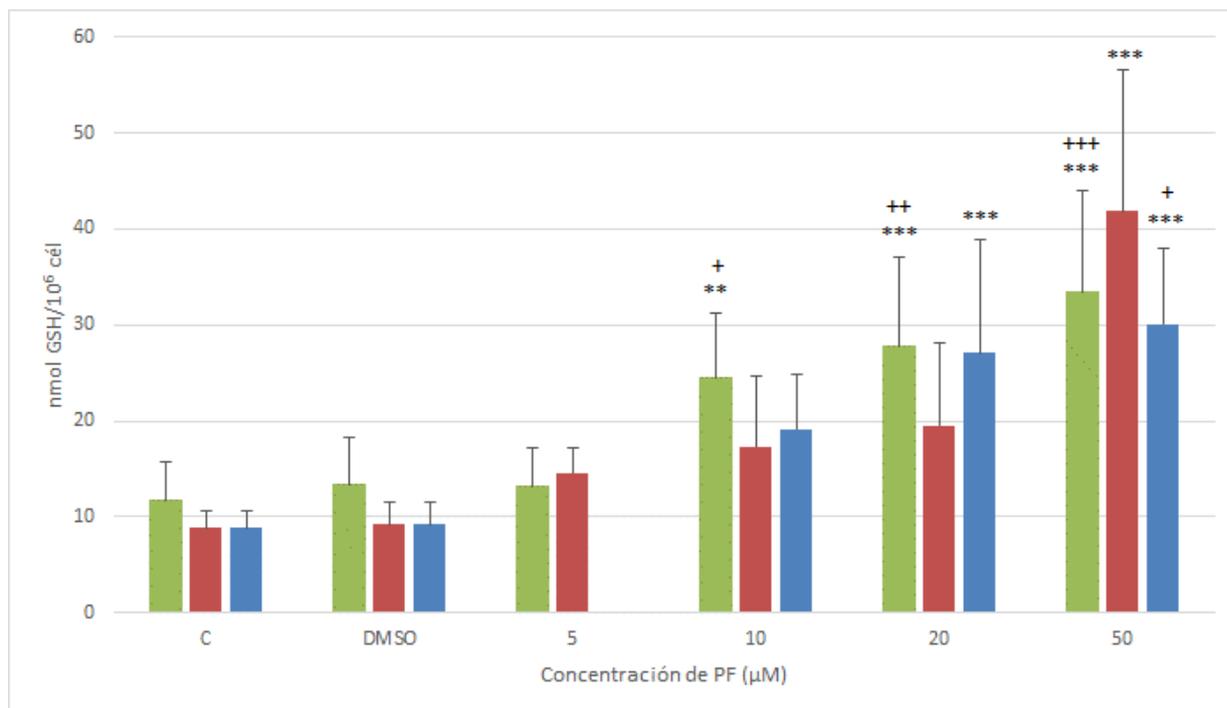
Por otra parte, para el resveratrol obtenemos un valor de $F=17.22$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=34.58$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey que nos da diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos (control, resveratrol 5 , 10 y $20 \mu\text{M}$) y resveratrol $50 \mu\text{M}$ ($***p<0.001$).

Por último, para la quercetina obtenemos un valor de $F=14.20$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=22.29$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y quercetina 20 y $50 \mu\text{M}$ ($***p<0.001$), así como entre quercetina $10 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($+p<0.05$).

Tabla V-6

Media \pm DEM	Control	DMSO	$5 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$	$50 \mu\text{M}$
Pterostilbeno	11.63 ± 4.06	13.41 ± 4.91	13.25 ± 3.98	24.48 ^{**+} ± 6.65	27.75 ^{***++} ± 9.39	33.37 ^{***+} ⁺⁺ ± 10.59
Resveratrol	8.86 ± 1.78	9.23 ± 2.35	14.62 ± 2.61	17.31 ± 7.40	19.52 ± 8.52	41.84 ^{***} ± 14.81
Quercetina	8.86 ± 1.78	9.23 ± 2.35		19.14 ± 5.68	27.10 ^{***} ± 11.70	30.13 ^{***+} ± 7.81

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$; - $p<0.05$, -- $p<0.01$, --- $p<0.001$



Gráfica V-XXII Efecto de los PF en células A-375 a las 48h post-siembra

V.5.1.2 72 horas post-siembra

Para el pterostilbeno, obtenemos un valor de $F=12.30$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=25.41$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($***p < 0.001$), además de diferencias significativas entre el grupo de pterostilbeno $5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($+p < 0.05$, $++p < 0.01$, $+++p < 0.001$).

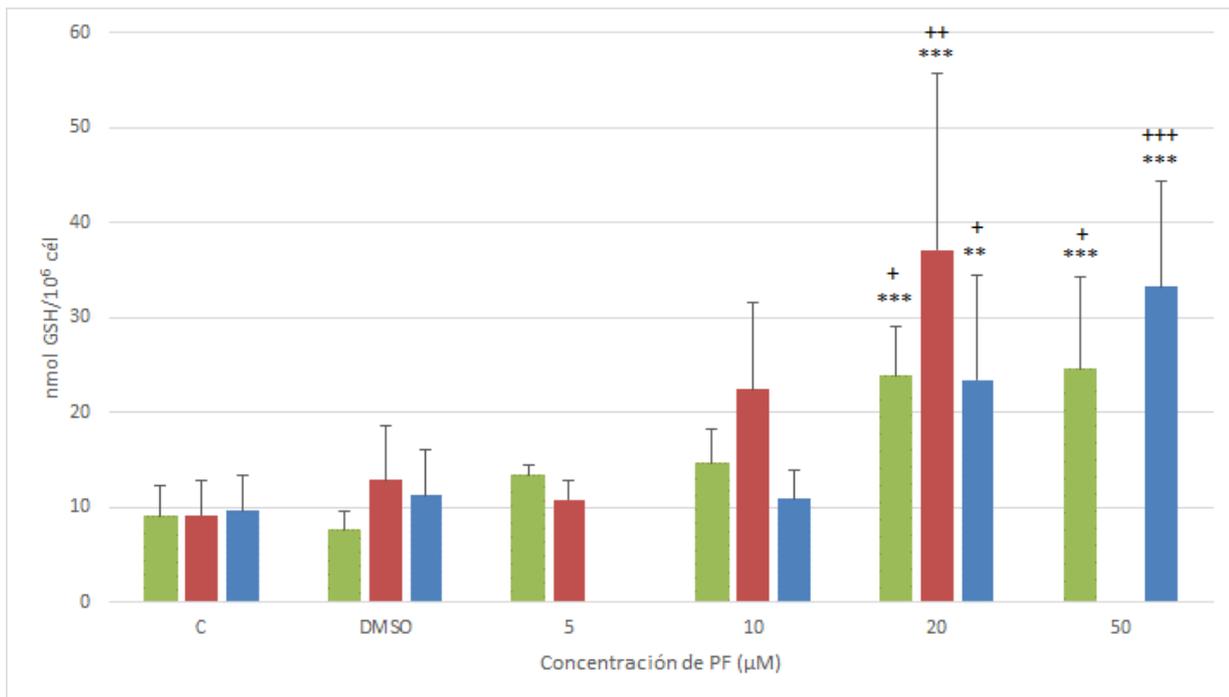
En el caso del resveratrol, para realizar los cálculos estadísticos, descartamos el grupo de resveratrol $50 \mu\text{M}$ porque debido al número tan reducido de células supervivientes, los niveles de GSH salen excesivamente altos y con una gran desviación estándar (166.61 ± 53.91). Para el resto de datos, obtenemos un valor de $F=8.36$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas iguales nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=23.35$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y resveratrol $20 \mu\text{M}$ ($***p < 0.001$), así como entre resveratrol $5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ ($++p < 0.01$).

Por último, para la quercetina, obtenemos un valor de $F=12.05$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.01$ y $F=15.85$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$), además de diferencias significativas entre el grupo de quercetina $10 \mu\text{M}$ y los grupos $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ ($+p < 0.05$, $+++p < 0.001$).

Tabla V-7

Media ± DEM	Control	DMSO	5 µM	10 µM	20 µM	50 µM
Pterostilbeno	9.04 ±3.22	7.55 ±2.06	13.38 ±1.07	14.59 ±3.73	23.85 ^{***+} ±5.15	24.46 ^{***+} ±9.73
Resveratrol	9.20 ±3.58	12.91 ±5.62	10.80 ±2.02	22.46 ±9.05	37.10 ^{***++} ±18.55	166.61 ±53.91
Quercetina	9.68 ±3.74	11.29 ±4.72		10.91 ±3.06	23.44 ^{**+} ±11.10	33.21 ^{***+++} ±11.09

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, --p<0.01, ---p<0.001



Gráfica V-XXIII Efecto de los PF en células A-375 a las 72h post-siembr

V.5.1.3 96 horas post-siembr

Para el pterostilbeno, para realizar los cálculos estadísticos, descartamos el grupo de 50 µM porque debido al número tan reducido de células supervivientes, los niveles de GSH salen excesivamente altos y con una gran desviación estándar (135.10 ± 85.19). Para el resto de datos, obtenemos un valor de F=16.32, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. Realizamos el test de múltiples comparaciones de

Tukey que nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones 10 μM y 20 μM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), además de diferencias significativas entre el grupo de pterostilbeno 5 μM y 20 μM (+++ $p < 0.001$) y entre el grupo de pterostilbeno 10 μM y 20 μM (- $p < 0.05$).

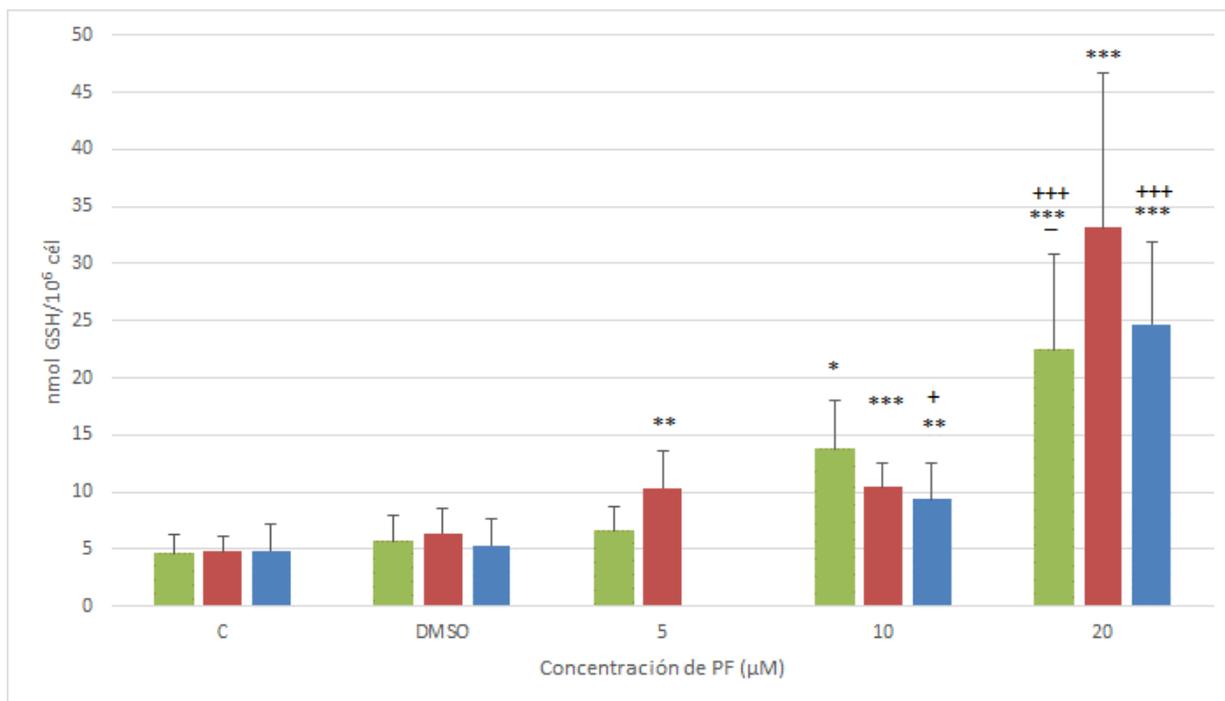
En el caso del resveratrol, también descartamos para realizar la estadística, el grupo de 50 μM porque debido al número tan reducido de células supervivientes, los niveles de GSH salen excesivamente altos y con una gran desviación estándar (248.53 \pm 56.06). Para el resto de datos, obtenemos un valor de $F = 19.47$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey que nos da diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos (control, resveratrol 5 y 10 μM) y resveratrol 20 μM (*** $p < 0.001$).

Por último, para la quercetina obtenemos un valor de $F = 53.31$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p < 0.001$) con un IC del 95%. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y el grupo de pterostilbeno 10 μM y las condiciones 20 μM y 50 μM (+++ $p < 0.001$, *** $p < 0.001$), además de diferencias significativas entre el grupo de quercetina 20 μM y quercetina 50 μM (- - $p < 0.001$).

Tabla V-8

Media \pm DEM	Control	DMSO	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	4.63 ± 1.63	5.71 ± 2.20	6.63 ± 2.05	13.78* ± 4.26	22.39***+++- ± 8.44	135.10 ± 85.19
Resveratrol	4.81 ± 1.38	6.19 ± 2.14	10.39** ± 3.20	10.47*** ± 2.15	33.18*** ± 13.46	248.50 ± 56.06
Quercetina	4.90 ± 2.26	5.31 ± 2.41		9.41 ± 3.18	24.68***+++ ± 7.28	52.95***+++ - - ± 14.79

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; - $p < 0.05$, - - $p < 0.01$, - - - $p < 0.001$



Gráfica V-XXIV Efecto de los PF en células A-375 a las 96h post-siembra

V.5.2 Pulmón (A-549)

V.5.2.1 48 horas post-siembra

Para el pterostilbeno, obtenemos un valor de $F=5.90$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.01$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas no reconoce que haya diferencias significativas. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey nos da diferencias significativas en la comparación entre pterostilbeno $10\ \mu\text{M}$ y pterostilbeno $50\ \mu\text{M}$ ($++p<0.01$).

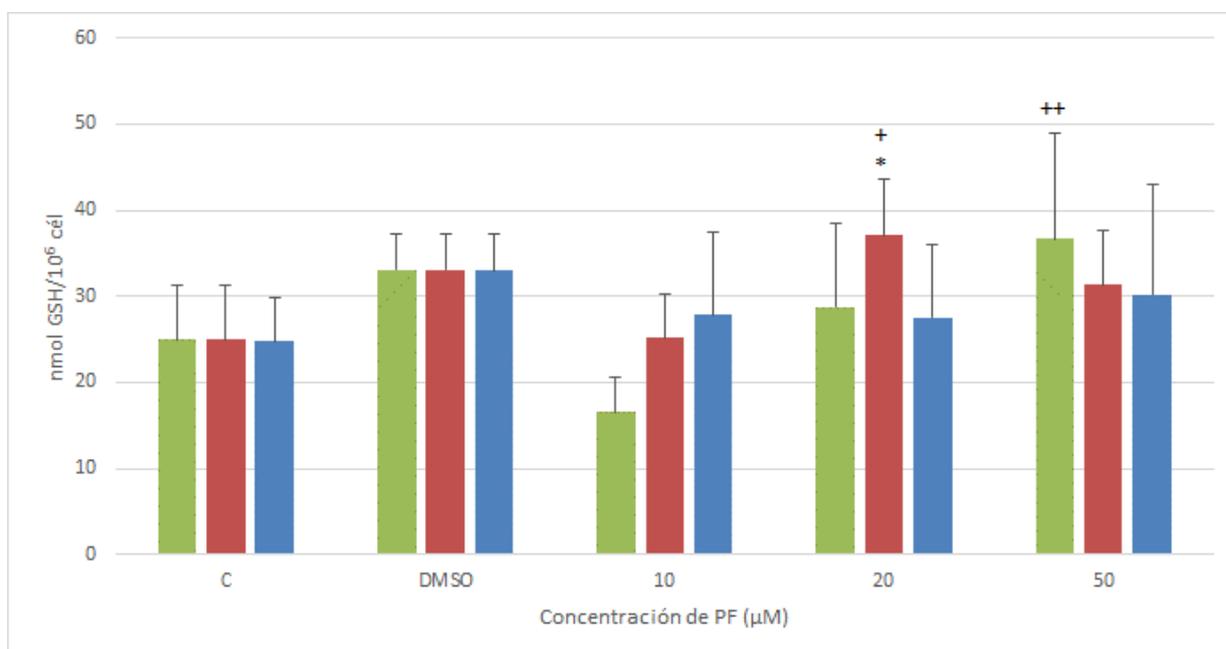
Por otra parte, para el resveratrol obtenemos un valor de $F=5.013$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.01$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas no reconoce diferencias significativas. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey que nos da diferencias significativas en la comparación entre los grupos control y resveratrol $10\ \mu\text{M}$ y el grupo de resveratrol $20\ \mu\text{M}$ ($*p<0.05$).

Para la quercetina obtenemos un valor de $F=1.269$ y $p=0.2977$, por lo que aceptamos la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.05$ y $F=9.844$.

Tabla V-9

Media ± DEM	Control	DMSO	10 µM	20 µM	50 µM
Pterostilbena	24.98±6.23	33.06±4.23	16.58±3.95	28.77±9.60	36.70 ⁺⁺ ±12.20
Resveratrol	24.98±6.23	33.06±4.23	25.22±5.05	37.09 ^{*+} ±6.61	31.33±6.29
Quercetina	24.74± 5.20	33.02±4.21	27.88±9.61	27.530±8.55	30.2±12.78

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, - -p<0.01, - - -p<0.001



Gráfica V-XXV Efecto de los PF en células A-549 a las 48h post-siembra

V.5.2.2 72 horas post-siembra

Para el pterostilbena obtenemos un valor de $F=7.01$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.01$ y $F=18.25$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas entre los distintos grupos y pterostilbena 50 µM ($-p<0.05$, $++p<0.01$, $**p<0.01$).

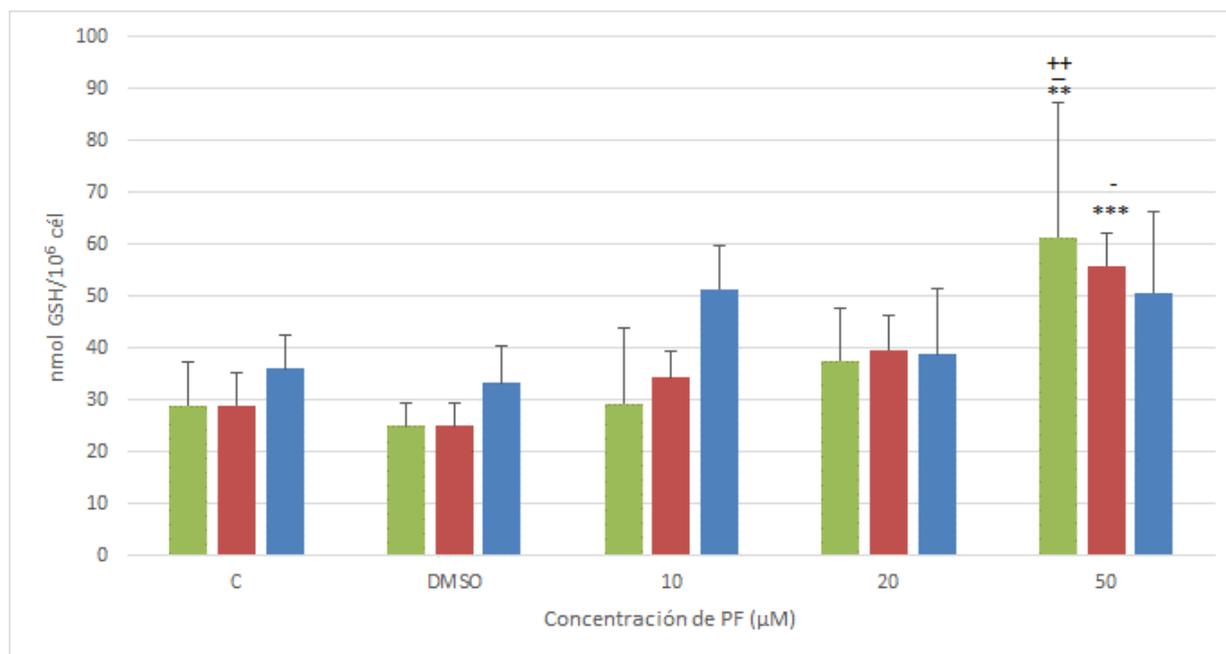
Por otra parte, para el resveratrol obtenemos un valor de $F=14.20$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y resveratrol 50 µM ($***p<0.001$), así como entre resveratrol 20 µM y 50 µM ($-p<0.05$).

Para la quercetina obtenemos un valor de $F=4.345$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.01$) con un IC del 95%. El test de múltiples comparaciones de Tukey nos dice que no hay diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos.

Tabla V-10

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	28.97 \pm 8.31	25.09 \pm 4.20	29.29 \pm 14.55	37.51 \pm 10.14	61.41 ^{**+++} \pm 25.94
Resveratrol	28.97 \pm 8.31	25.09 \pm 4.20	34.23 \pm 8.90	39.71 \pm 5.89	55.86 ^{***} \pm 12.21
Quercetina	36.02 \pm 6.36	33.28 \pm 7.28	51.32 \pm 8.45	38.74 \pm 12.73	50.62 \pm 15.62

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$; - $p<0.05$, -- $p<0.01$, --- $p<0.001$



Gráfica V-XXVI Efecto de los PF en células A-549 a las 72h post-siembra

V.5.2.3 96 horas post-siembra

Para el pterostilbeno obtenemos un valor de $F=28.29$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=21.14$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey, que nos indica que hay diferencias significativas

en la comparación entre pterostilbeno 50 μM y los demás grupos ($p < 0.001$), así como entre pterostilbeno 20 μM y el grupo control y pterostilbeno 10 μM ($+p < 0.05$, $**p < 0.01$).

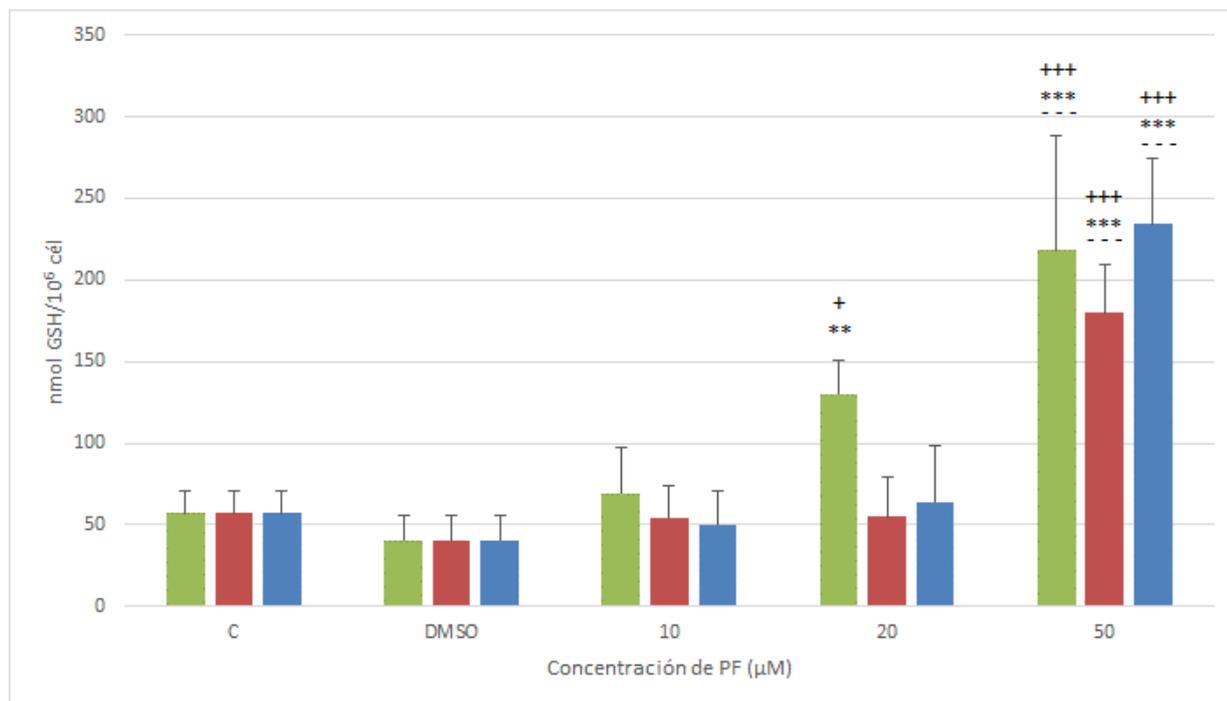
Para el resveratrol obtenemos un valor de $F=35.33$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p < 0.001$) con un IC del 95%. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos (control, resveratrol 10 y 20 μM) y resveratrol 50 μM ($***p < 0.001$).

Por último, para la quercetina obtenemos un valor de $F=46.63$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo de pterostilbeno 50 μM y el resto de condiciones ($***p < 0.001$).

Tabla V-11

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	56.99 ± 13.94	40.80 ± 15.33	69.45 ± 27.47	130.23 ^{**+} ± 20.00	218.08 ^{***+++---} ± 70.50
Resveratrol	56.99 ± 13.94	40.80 ± 15.33	54.35 ± 19.90	54.78 ± 24.19	179.7 ^{***++++---} ± 29.75
Quercetina	56.99 ± 13.94	40.80 ± 15.33	50.43 ± 20.79	64.25 ± 33.96	234.4 ^{***++++---} ± 40.24

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; - $p < 0.05$, -- $p < 0.01$, --- $p < 0.001$



Gráfica V-XXVII Efecto de los PF en células A-549 a las 96h post-siembra

V.5.3 Mama (MCF-7)

V.5.3.1 48 horas post-siembra

Para el pterostilbeno obtenemos un valor de $F=5.33$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.01$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.01$ y $F=13.54$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey, que nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y pterostilbeno 50 μM (** $p<0.01$).

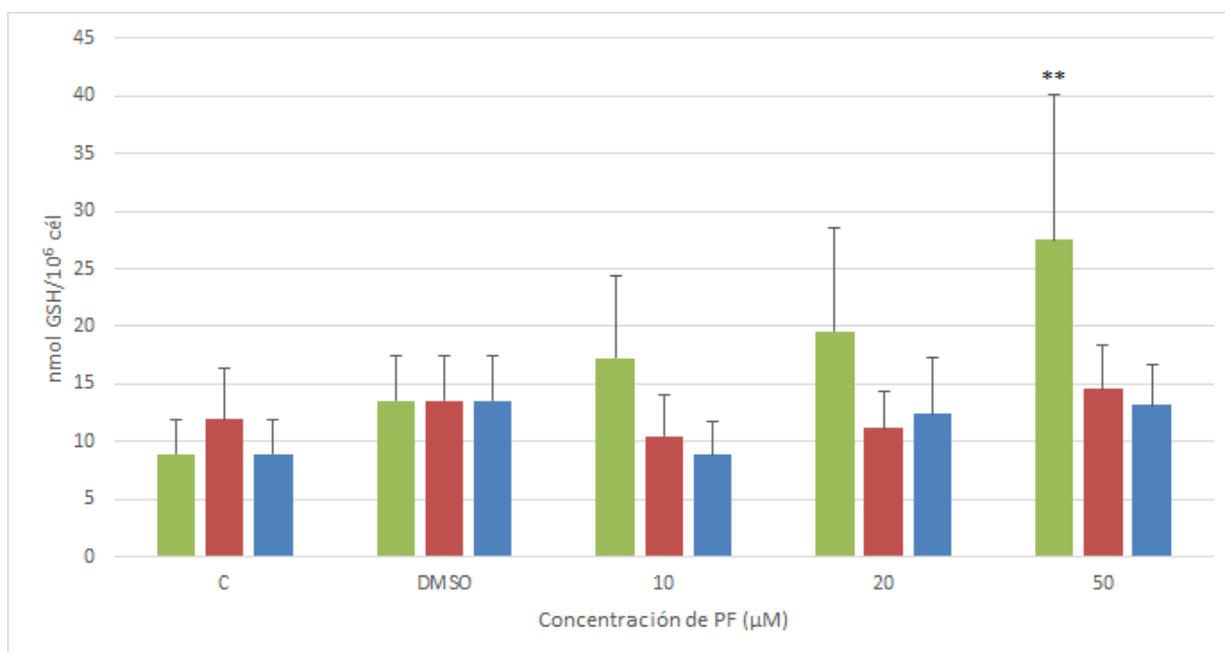
En el caso del resveratrol, obtenemos un valor de $F=1.27$ y una $p=0.3054$, por lo que aceptamos la hipótesis nula con un IC del 95%; no existen diferencias significativas en los niveles de GSH para concentraciones de resveratrol entre 0-50 μM en células MCF-7.

Por último, para la quercetina, obtenemos un valor de $F=2.35$ y una $p=0.0809$, por lo que aceptamos la hipótesis nula con un IC del 95%; no existen diferencias significativas en los niveles de GSH para concentraciones de quercetina entre 0-50 μM en células MCF-7.

Tabla V-12

Media ± DEM	Control	DMSO	10 µM	20 µM	50 µM
Pterostilbeno	8.96±2.96	13.53±3.96	17.28±7.15	19.56±9.03	27.49** ±12.62
Resveratrol	8.96±2.96	13.53±3.96	10.46±3.61	11.16±3.15	14.59±3.73
Quercetina	8.96±2.96	13.53±3.96	8.90±2.80	12.37±4.87	13.18±3.50

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, - -p<0.01, - - -p<0.001



Gráfica V-XXVIII Efecto de los PF en células MCF-7 a las 48h post-siembra

V.5.3.2 72 horas post-siembra

Para el pterostilbeno obtenemos un valor de $F=14.70$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=26.03$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ (** $p<0.01$, *** $p<0.001$), además de diferencias significativas entre el pterostilbeno $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ y el grupo de $50 \mu\text{M}$ ($p<0.05$ y +++ $p<0.001$).

En el caso del resveratrol, obtenemos un valor de $F=9.93$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas iguales no encuentra diferencias significativas ($p=0.2253$). Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la

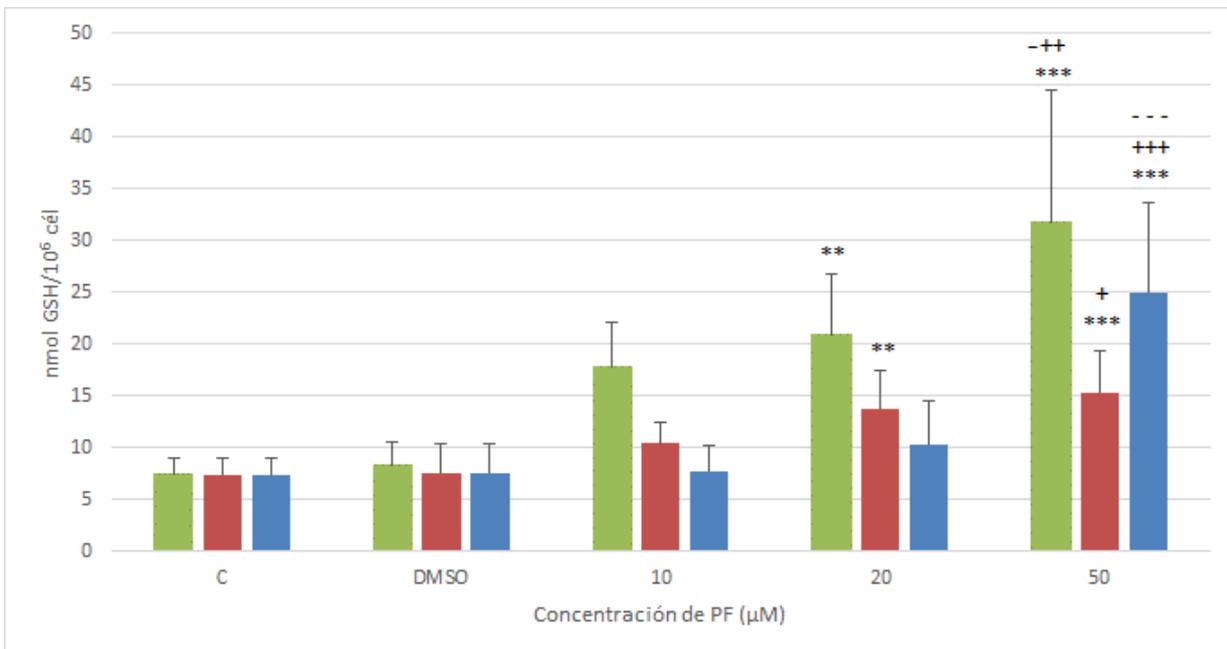
comparación entre el grupo control y resveratrol 20 μM y 50 μM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), así como entre resveratrol 10 μM y 50 μM (+ $p < 0.05$).

Mientras que para la quercetina, obtenemos un valor de $F = 16.66$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p < 0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.01$ y $F = 15.76$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo 50 μM y el resto de grupos (*** $p < 0.001$).

Tabla V-13

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	7.42 \pm 1.59	7.60 \pm 2.79	17.80 \pm 4.36	20.98** \pm 5.75	31.71***++- \pm 12.83
Resveratrol	7.42 \pm 1.59	7.60 \pm 2.79	10.43 \pm 2.09	13.77** \pm 3.60	15.31***+ \pm 4.00
Quercetina	7.42 \pm 1.59	7.60 \pm 2.79	7.75 \pm 2.53	10.34 \pm 4.19	25.00***+++--- \pm 8.57

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; - $p < 0.05$, -- $p < 0.01$, --- $p < 0.001$



Gráfica V-XXIX Efecto de los PF en células MCF-7 a las 72h post-siembra

V.5.3.3 96 horas post-siembra

Para el pterostilbeno obtenemos un valor de $F=23.02$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.001$ y $F=24.99$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ (** $p<0.01$, *** $p<0.001$), además de diferencias significativas entre los grupos $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ y el grupo de pterostilbeno $50 \mu\text{M}$ (- $p<0.01$, +++ $p<0.001$).

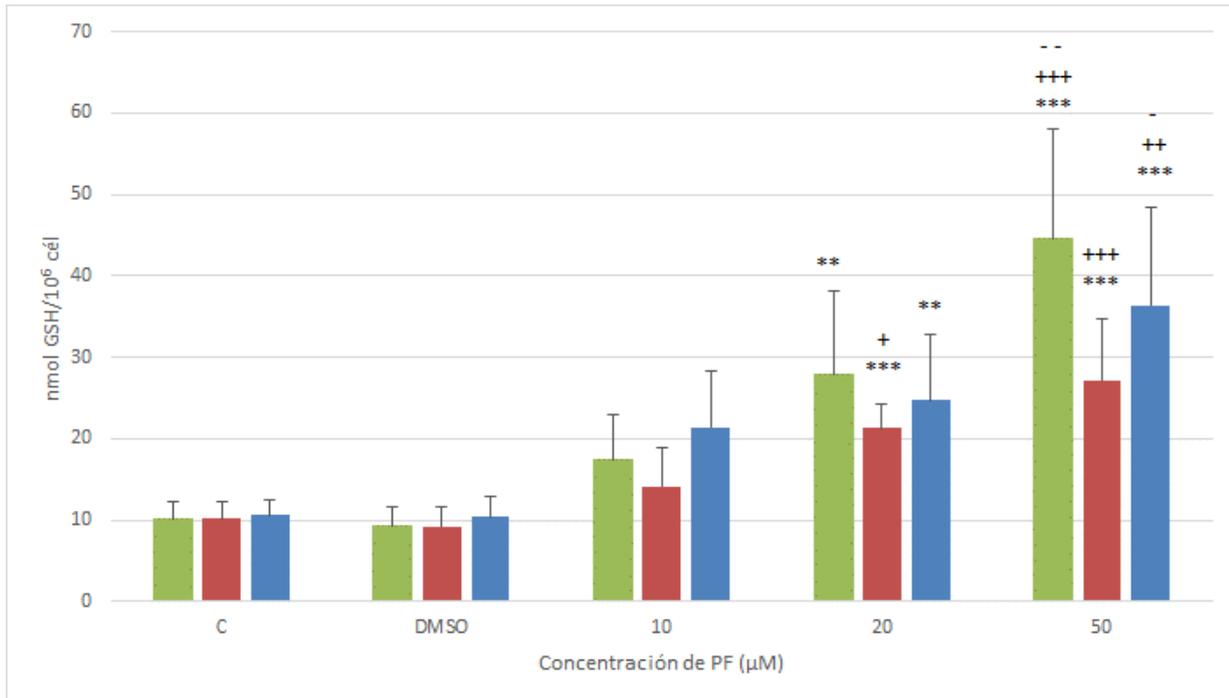
En el caso del resveratrol obtenemos un valor de $F=21.26$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.05$ y $F=11.19$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey, que nos da diferencias significativas entre el grupo control y resveratrol $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ (*** $p<0.001$), así como entre resveratrol $10 \mu\text{M}$ y resveratrol $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ (+ $p<0.05$, +++ $p<0.001$).

Por último, para la quercetina obtenemos un valor de $F=17.30$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.001$ y $F=20.42$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones $20 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$ (** $p<0.01$, *** $p<0.001$), además de diferencias significativas entre quercetina $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ y el grupo de quercetina $50 \mu\text{M}$ ($p<0.05$, ++ $p<0.01$).

Tabla V-14

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	10.14 \pm 2.07	9.21 \pm 2.34	17.30 \pm 5.69	27.79** \pm 10.46	44.60***+++-- \pm 13.39
Resveratrol	10.14 \pm 2.07	9.21 \pm 2.34	14.10 \pm 4.70	21.31***+ \pm 3.02	27.22***+++ \pm 7.48
Quercetina	10.14 \pm 2.07	9.21 \pm 2.34	18.82 \pm 6.36	49.35** \pm 14.55	105.90***++- \pm 29.57

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$; - $p<0.05$, - $p<0.01$, -- $p<0.001$



Gráfica V-XXX Efecto de los PF en células MCF-7 a las 96h post-siembra

V.5.4 Colon (HT-29)

V.5.4.1 48 horas post-siembra

Para el pterostilbeno, obtenemos un valor de $F=10.04$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula con un IC del 95% ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.01$ y $F=13.60$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo de pterostilbeno 50 µM y el resto de concentraciones ($p<0.05$, $+++p<0.001$, $***p<0.001$).

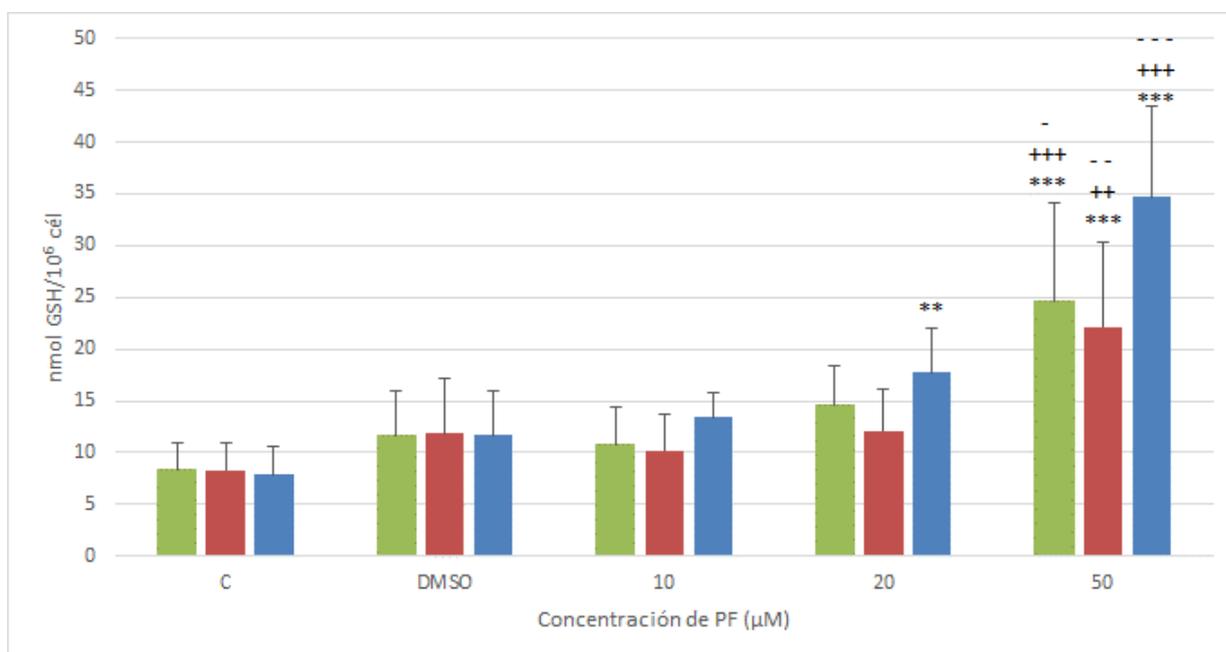
En el caso del resveratrol, obtenemos un valor de $F=7.76$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas no detecta diferencias significativas ($p=0.0683$ y $F=8.73$). Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey nos da diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos (control, resveratrol 10 y 20 µM) y resveratrol 50 µM ($p<0.01$, $++p<0.01$, $***p<0.001$).

Para la quercetina, obtenemos un valor de $F=36.33$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p < 0.05$ y $F=9.99$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey, que nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y quercetina 20 y 50 µM ($***p<0.001$), así como entre quercetina 10 y 20 µM y quercetina 50 µM ($---p<0.001$, $+++p<0.001$).

Tabla V-15

Media ± DEM	Control	DMSO	10 µM	20 µM	50 µM
Pterostilbeno	8.35±2.54	11.68±4.21	10.70±3.68	14.59±3.76	24.55 ^{***++++} ±9.54
Resveratrol	8.35±2.54	11.68±4.21	10.18±3.57	12.15±4.03	22.13 ^{***+++} ±8.13
Quercetina	8.35±2.54	11.68±4.21	13.43±2.15	17.74 ^{**} ±4.56	34.67 ^{***++++} ±7.53

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001; -p<0.05, - -p<0.01, - - -p<0.001



Gráfica V-XXXI Efecto de los PF en células HT-29 a las 48h post-siembra

V.5.4.2 72 horas post-siembra

Para el pterostilbeno obtenemos un valor de $F=20.84$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.01$ y $F=16.30$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey nos da diferencias significativas en la comparación entre el grupo control y las condiciones 20 µM y 50 µM (* $p<0.05$, *** $p<0.001$), además de diferencias significativas entre el grupo de pterostilbeno 10 µM y 20 µM y el grupo pterostilbeno 50 µM (- - $p<0.001$, +++ $p<0.001$).

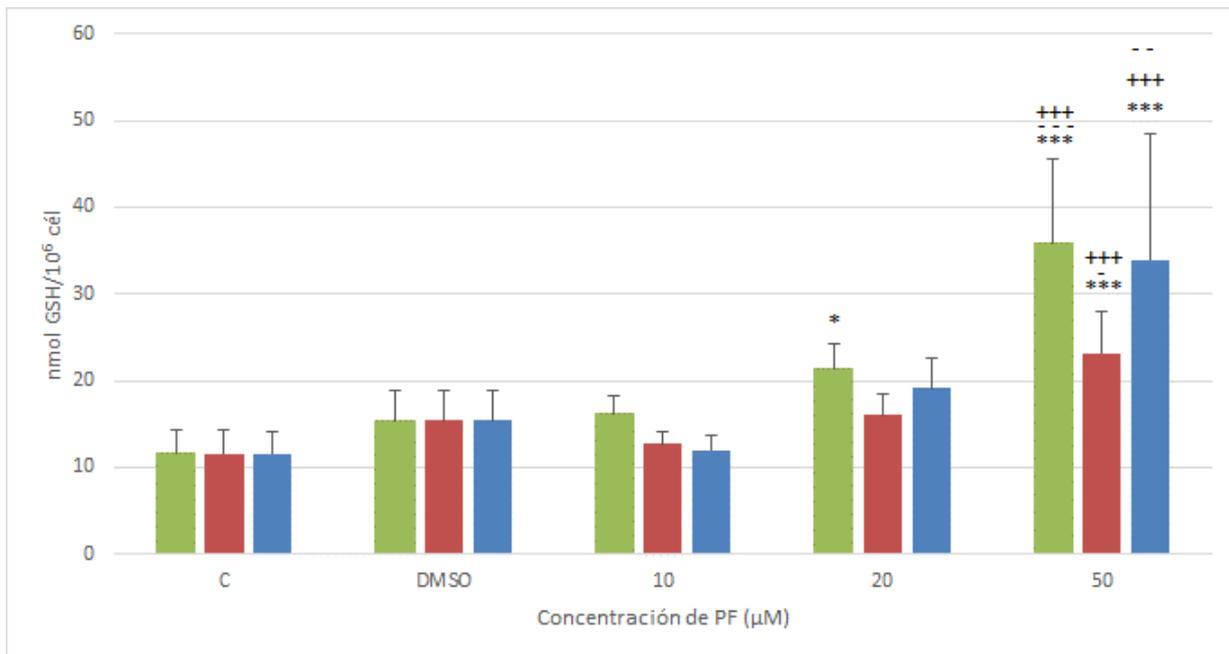
En el caso del resveratrol obtenemos un valor de $F=11.22$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas iguales no detecta diferencias significativas ($p=0.1909$ y $F=6.11$). Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el resveratrol 50 µM y el resto de grupos ($p<0.05$, +++ $p<0.001$, *** $p<0.001$).

Mientras que para la quercetina obtenemos un valor de $F=11.34$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.001$ y $F=28.26$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y nos da diferencias significativas en la comparación entre el resveratrol 50 μM y el resto de grupos ($-p<0.01$, $+++p<0.001$, $***p<0.001$).

Tabla V-16

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	11.58 \pm 2.79	15.39 \pm 3.43	16.12 \pm 2.18	21.40* \pm 2.83	35.78***++++ \pm 9.83
Resveratrol	11.58 \pm 2.79	15.39 \pm 3.43	12.68 \pm 1.38	16.07 \pm 2.38	23.16***++++ \pm 4.87
Quercetina	11.58 \pm 2.79	15.39 \pm 3.43	11.96 \pm 1.79	19.15 \pm 3.42	33.90***++++ \pm 14.56

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$; - $p<0.05$, -- $p<0.01$, --- $p<0.001$



Gráfica V-XXXII Efecto de los PF en células HT-29 a las 72h post-siembra

V.5.4.3 96 horas post-siembra

Para el pterostilbeno, obtenemos un valor de $F=22.03$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula. El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.001$ y $F=18.89$. Realizamos el

test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre el grupo de pterostilbeno 50 μM y el resto de concentraciones ($-p<0.05$, $+++p<0.001$, $***p<0.001$).

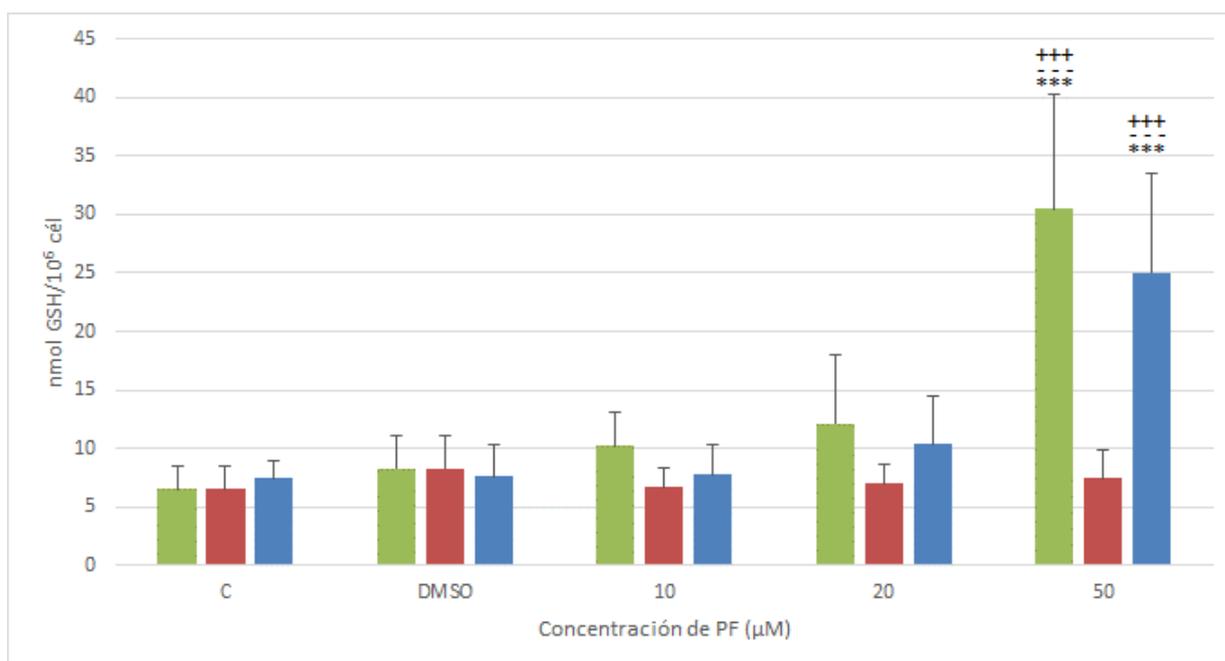
Para el resveratrol, obtenemos un valor de $F=0.6843$ y una $p=0.6086$, por lo que aceptamos la hipótesis nula con un IC del 95%; no existen diferencias significativas en los niveles de GSH para concentraciones de resveratrol entre 0-50 μM en células HT-29.

En el caso de la quercetina obtenemos un valor de $F=15.51$, lo cual nos permite rechazar la hipótesis nula ($p<0.001$). El test de Bartlett para varianzas homogéneas nos da un valor de $p<0.01$ y $F=17.70$. Realizamos el test de múltiples comparaciones de Tukey y obtenemos diferencias significativas en la comparación entre los distintos grupos y quercetina 50 μM ($---p<0.001$, $+++p<0.001$, $***p<0.001$).

Tabla V-17

Media \pm DEM	Control	DMSO	10 μM	20 μM	50 μM
Pterostilbeno	6.56 \pm 1.97	8.27 \pm 2.85	10.18 \pm 2.86	12.15 \pm 5.90	30.52 ^{***+++---} \pm 9.76
Resveratrol	6.56 \pm 1.97	8.27 \pm 2.85	6.71 \pm 1.68	7.01 \pm 1.56	7.42 \pm 2.48
Quercetina	6.56 \pm 1.97	7.41 \pm 1.85	7.40 \pm 1.01	9.38 \pm 2.15	19.03 ^{***+++---} \pm 6.42

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; + $p<0.05$, ++ $p<0.01$, +++ $p<0.001$; - $p<0.05$, -- $p<0.01$, --- $p<0.001$



Gráfica V-XXXIII Efecto de los PF en células HT-29 a las 96h post-siembr

V.6 Síntesis y eflujo de GSH

Como podemos observar en la *tabla V-18* el tratamiento con ambos polifenoles (concentraciones de 20 μ M, 72 horas post-siembra) incrementa significativamente la síntesis de GSH. Este aumento puede atribuirse al incremento de la actividad γ -GCS. Si analizamos los resultados, vemos que para las células A-549 el resveratrol produce un mayor aumento en la actividad γ -GCS y en la la síntesis de GSH que el pterostilbeno, mientras que para las tres líneas restantes sucede a la inversa. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas para la actividad de la GSH sintetasa en las células tratadas con polifenol en comparación con el control. Tampoco encontramos diferencias significativas en la tasa de liberación del glutatión.

Tabla V-18

	GSH (nmol/10 ⁶ cel)			γ -GCS (mU/10 ⁶ cel)		
	Control	Resv	Pter	Control	Resv	Pter
A-375	11 ± 2	21** ± 4	27** ± 5	126 ± 21	154 ± 19	177** ± 31
A-549	24 ± 5	35** ± 7	29 ± 6	174 ± 20	236** ± 25	204 ± 25
MCF-7	9 ± 3	12 ± 4	21** ± 3	102 ± 17	113 ± 30	135** ± 16
HT-29	8 ± 3	13 ± 4	16** ± 4	112 ± 8	117 ± 16	144** ± 27

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tabla V-19

	GS (mU/10 ⁶ cel)			eflujo (nmol GSH+2GSSG/10 ⁶ cel·h)		
	Control	Resv	Pter	Control	Resv	Pter
A-375	20 ± 6	22 ± 4	19 ± 3	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.5
A-549	27 ± 5	25 ± 5	30 ± 8	2.4 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.3 ± 0.4
MCF-7	19 ± 3	16 ± 5	17 ± 3	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3
HT-29	18 ± 7	20 ± 6	21 ± 3	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.5

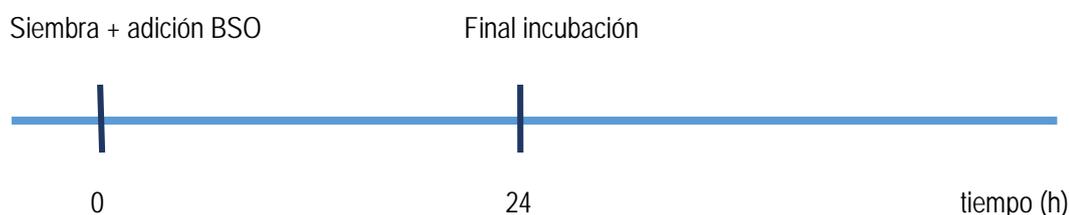
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

V.7 Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento in vitro de las células deplecionadas de GSH

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado anterior, decidimos estudiar el efecto del resveratrol y del pterostilbena sobre las células deplecionadas de GSH. Para ello, incubamos las células en presencia de BSO 0.1 mM y 0.5 mM.

En primer lugar, sembramos las placas con $2 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se añadió la BSO en ese momento. Se sembraron placas sin BSO a modo de control.

En un primer experimento, a las 24 horas post-siembra se levantaron las placas control incubadas en presencia de BSO y sin BSO y se realizó el recuento celular, se midió la viabilidad celular y se determinaron los niveles de GSH. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió 2 veces.



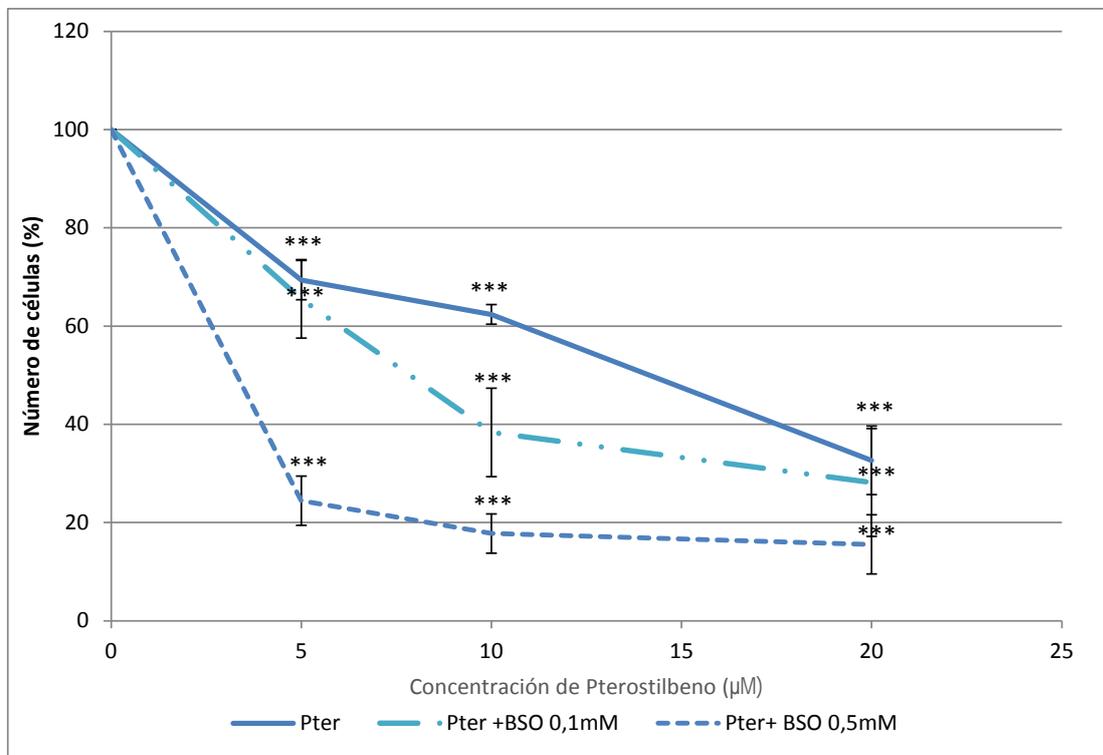
En un segundo experimento, transcurridas 24 horas post-siembra, se realizó la adición de los polifenoles y se recogieron, contaron y determinaron los niveles de GSH de las células a las 72h post-siembra. Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió 2 veces.



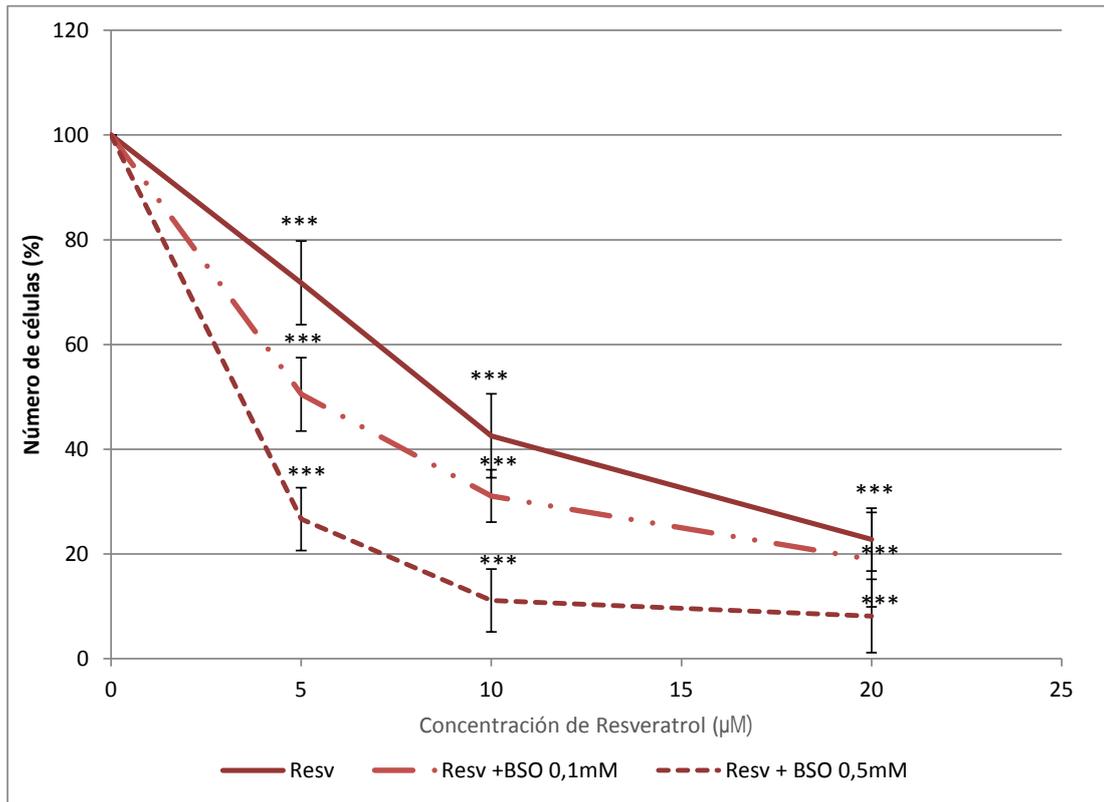
V.7.1 Melanoma (A-375)

Al comparar los resultados obtenidos en células A-375, vemos que la adición de BSO a través de la depleción del glutatión produce muerte celular en cultivo, que se produce en mayor medida al aumentar la concentración de BSO añadido. Como podemos ver en las gráficas, para una concentración de pterostilbeno 20 μM el número de células vivas es del 16%, mientras que para esa misma concentración de resveratrol, el número de células vivas es del 8%.

En cuanto a la estadística, para ambos polifenoles obtenemos una $p < 0.01$, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula. Como observamos en las gráficas V-XXXIV y V-XXXV, para ambos polifenoles obtenemos diferencias significativas con el test de múltiples comparaciones de Tukey en la comparación entre el grupo control y todas las condiciones ($***p < 0.001$). Al añadir BSO, tanto 0.1 mM como 0.5 mM, obtenemos de nuevo diferencias significativas a todas las concentraciones estudiadas con $***p < 0.001$.



Gráfica V-XXXIV Efecto del pterostilbeno sobre las células A-375 tratadas con BSO



Gráfica V-XXXV Efecto del resveratrol sobre las células A-375 tratadas con BSO

V.7.2 Pulmón (A-549)

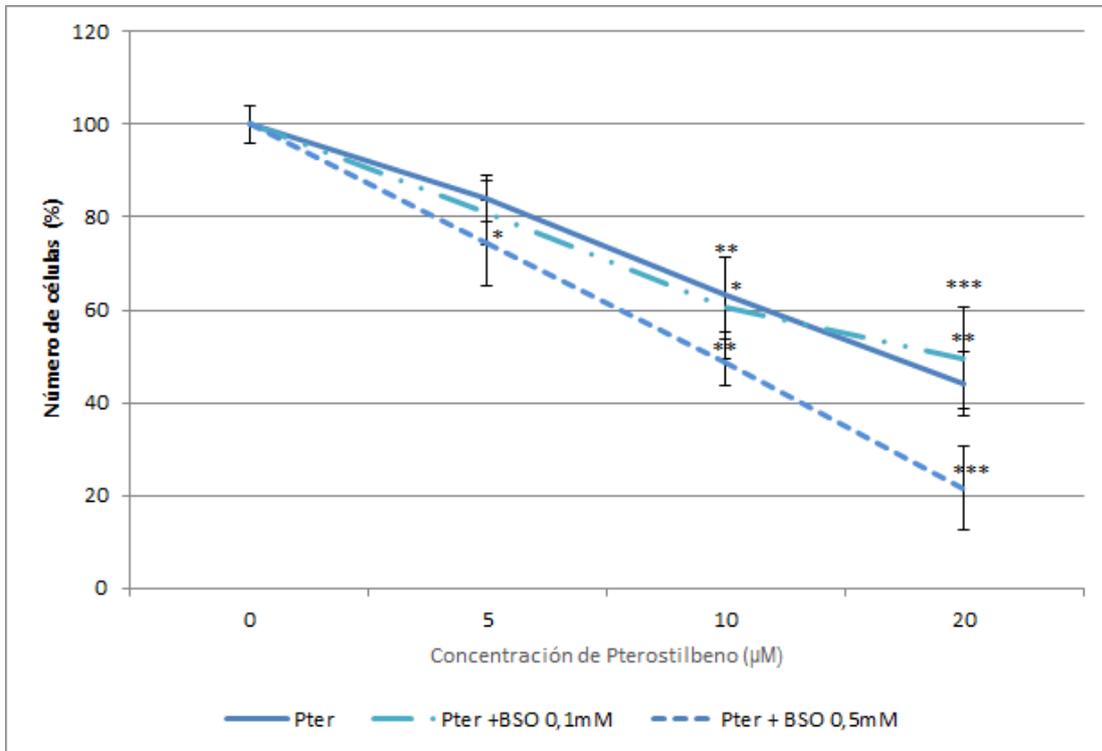
En el caso de las células A-549, podemos observar que la adición de BSO a través de la depleción del glutatión también produce muerte celular en cultivo, aunque este efecto no se observa a la concentración de BSO de 0.1 mM, donde el número de células vivas es incluso superior al control en algunas de las concentraciones de polifenol estudiadas. En cambio a una concentración de BSO de 0.5 mM si podemos observar claramente el descenso en el número de células que permanecen vivas en cultivo. Para una concentración de pterostilbeno 20 µM el número de células vivas a concentración 0.5 mM de BSO es del 21% y en el caso del resveratrol, el número de células vivas es del 30%.

En cuanto a la estadística, para ambos polifenoles obtenemos una $p < 0.01$, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula.

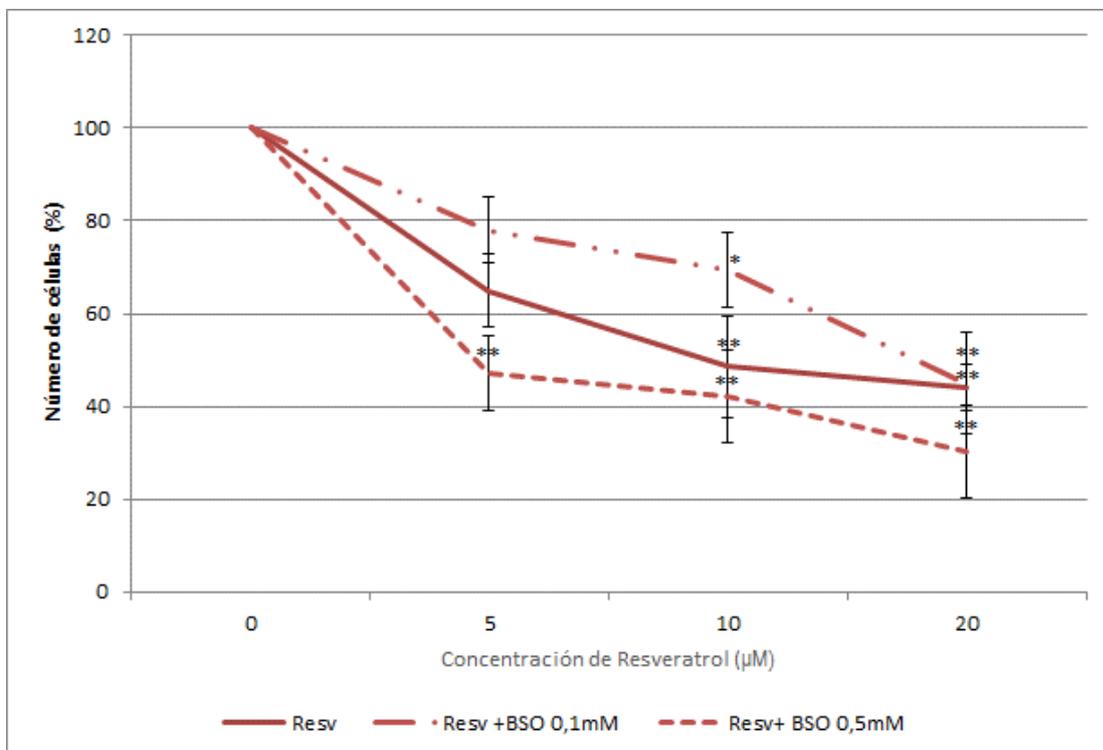
Para el pterostilbeno, obtenemos diferencias significativas con el test de múltiples comparaciones de Tukey en la comparación entre el grupo control y 10 µM y 20 µM ($**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente). Al añadir BSO 0.1 mM, obtenemos diferencias significativas con $*p < 0.05$ para 10 µM y $**p < 0.01$ para 20 µM, mientras que al añadir BSO 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas a las concentraciones de 5, 10 y 20 µM ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ respectivamente).

Por su parte, el resveratrol muestra diferencias significativas comparadas con el control a concentraciones 10 y 20 µM ($**p < 0.01$). Al añadir BSO 0.1 mM, obtenemos diferencias significativas a

concentraciones de 10 y 20 μM con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ respectivamente; mientras que al añadir BSO 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas ($**p < 0.01$) para todas las condiciones.



Gráfica V-XXXVI Efecto del pterostilbeno sobre las células A-549 tratadas con BSO



Gráfica V-XXXVII Efecto del resveratrol sobre las células A-549 tratadas con BSO

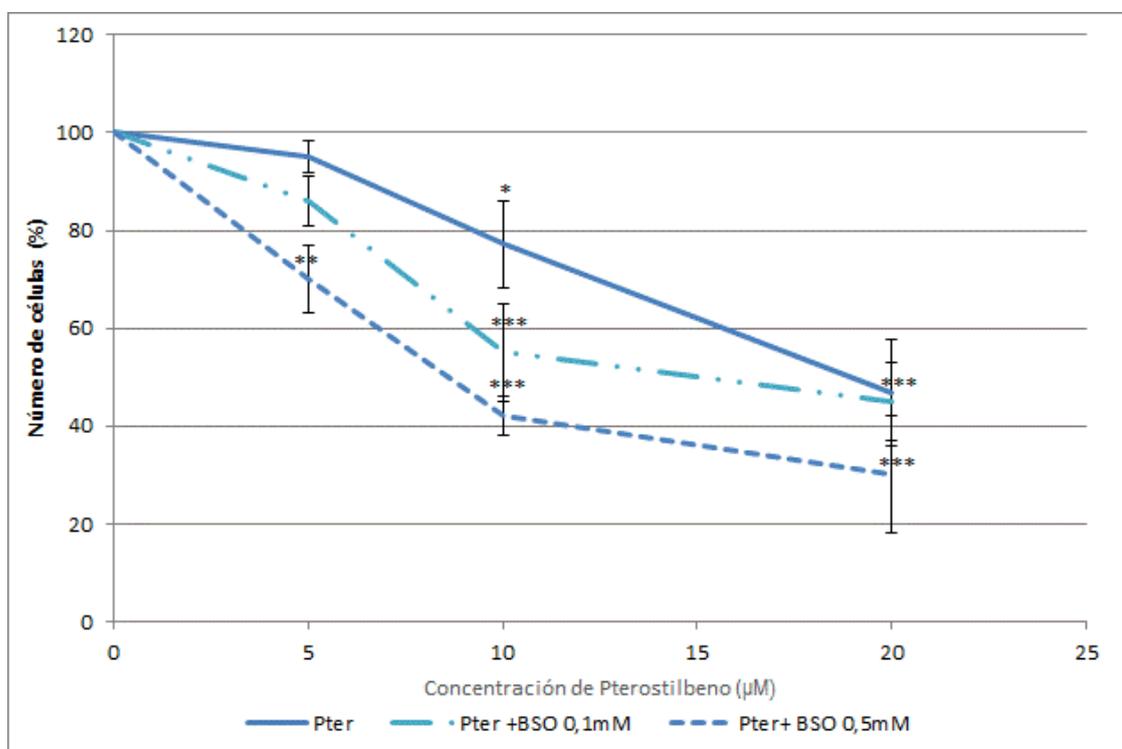
V.7.3 Mama (MCF-7)

En las células MCF-7 también podemos observar muerte celular por la adición de BSO. En la primera gráfica observamos que se produce una disminución celular paulatina, obteniendo a concentración 20 μM de pterostilbeno y 0.5 mM de BSO un 30% de células vivas. Para el caso del resveratrol, como podemos observar en la segunda gráfica, no se aprecia una mayor disminución para una concentración de BSO de 0.5 mM frente a una concentración de 0.1 mM, siendo los porcentajes finales para resveratrol 20 μM , 31% y 33% respectivamente.

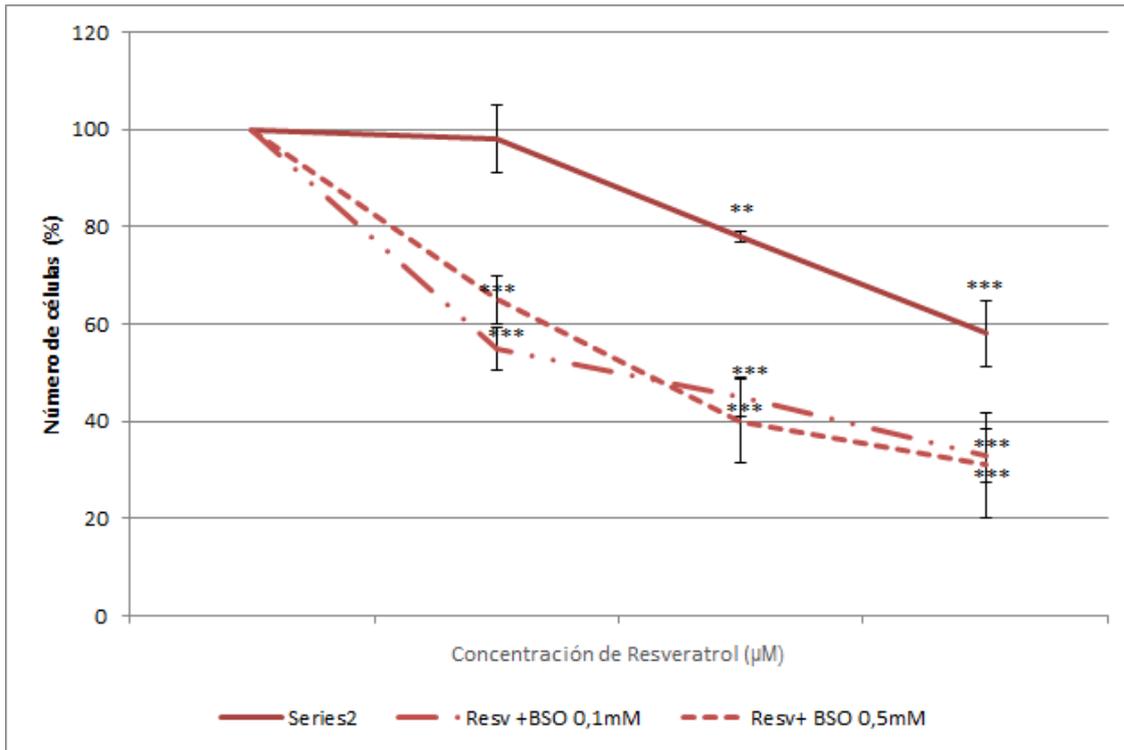
En cuanto a la estadística, para ambos polifenoles obtenemos una $p < 0.01$, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula.

Para el pterostilbeno obtenemos diferencias significativas con el test de múltiples comparaciones de Tukey en la comparación entre el grupo control y 10 μM y 20 μM ($*p < 0.05$ y $***p < 0.001$ respectivamente). Al añadir BSO 0.1 mM, obtenemos diferencias significativas con $***p < 0.001$ para 10 μM y 20 μM , mientras que al añadir BSO 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas a las concentraciones de 5 ($**p < 0.01$), 10 y 20 μM ($***p < 0.001$).

El resveratrol, en cambio, muestra diferencias significativas con $*p < 0.01$ y $***p < 0.001$ en 10 y 20 μM respectivamente, comparadas con el control; al añadir BSO, tanto 0.1 mM como 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas con $***p < 0.001$ para todas las condiciones, como podemos ver en la gráfica V-XXXIX.



Gráfica V-XXXVIII Efecto del pterostilbeno sobre las células MCF-7 tratadas con BSO



Gráfica V-XXXIX Efecto del resveratrol sobre las células MCF-7 tratadas con BSO

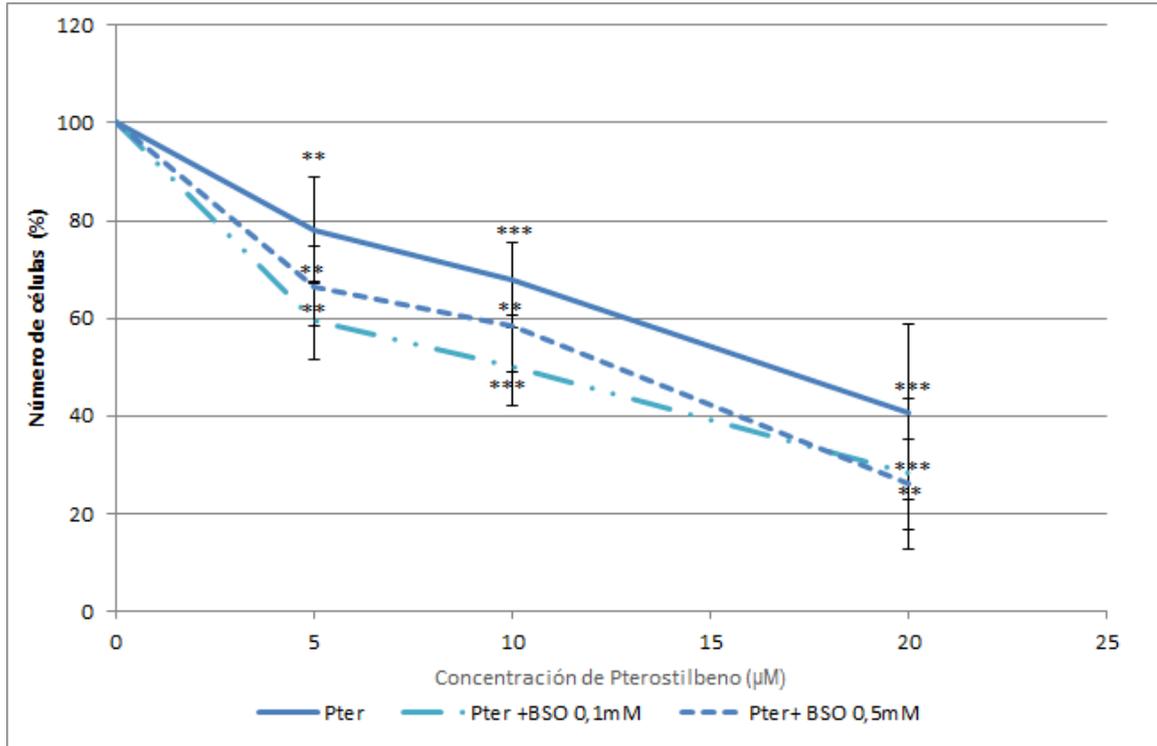
V.7.4 Colon (HT-29)

Por último, en las células HT-29 observamos que el efecto de la adición de BSO es menor que en las otras líneas tumorales. En el caso del pterostilbena podemos ver que no hay diferencias entre BSO 0.1 mM y BSO 0.5 mM y que los porcentajes de células vivas a una concentración de pterostilbena de 20 µM son para el grupo control 41%, mientras que para BSO 0.1 mM obtenemos un 28% y para BSO 0.5 mM un 26%. Para el resveratrol 20 µM, estos porcentajes se sitúan en 49%, 44% y 35% respectivamente.

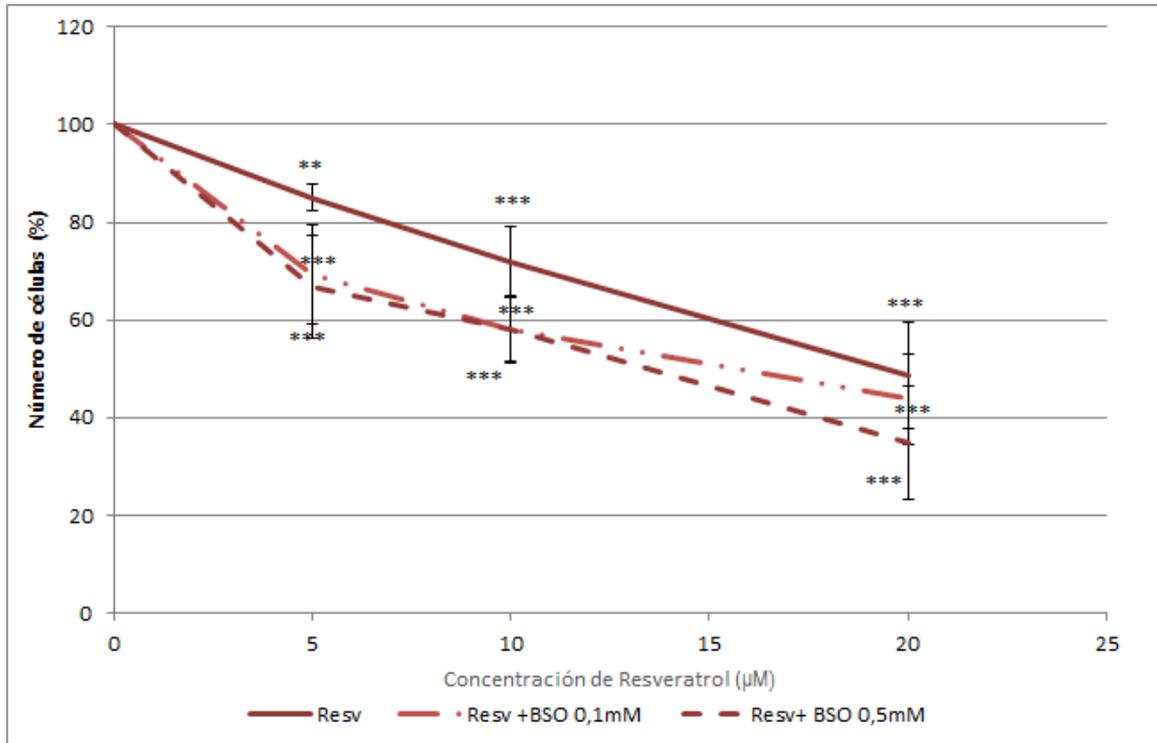
En cuanto a la estadística, para ambos polifenoles obtenemos una $p < 0.01$, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula.

Para el pterostilbena, obtenemos diferencias significativas con el test de múltiples comparaciones de Tukey en la comparación entre el grupo control con $**p < 0.01$ a concentraciones de 5 µM y $***p < 0.001$ a concentraciones 10 y 20 µM. Al añadir BSO 0.1 mM, obtenemos diferencias significativas con $**p < 0.01$ para 5 y 10 µM y $***p < 0.001$ para 20 µM; mientras que al añadir BSO 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas con $**p < 0.01$ a las concentraciones de 5 y 20 µM y $***p < 0.001$ a la concentración de 10 µM.

El resveratrol muestra diferencias significativas comparadas con el control a todas las concentraciones estudiadas ($**p < 0.01$ a concentración 5 µM y $***p < 0.001$ a concentraciones 10 y 20 µM). Al añadir BSO, tanto 0.1 mM y 0.5 mM, obtenemos diferencias significativas ($***p < 0.001$) para todas las condiciones.



Gráfica V-XL Efecto del pterostilbeno sobre las células HT-29 tratadas con BSO



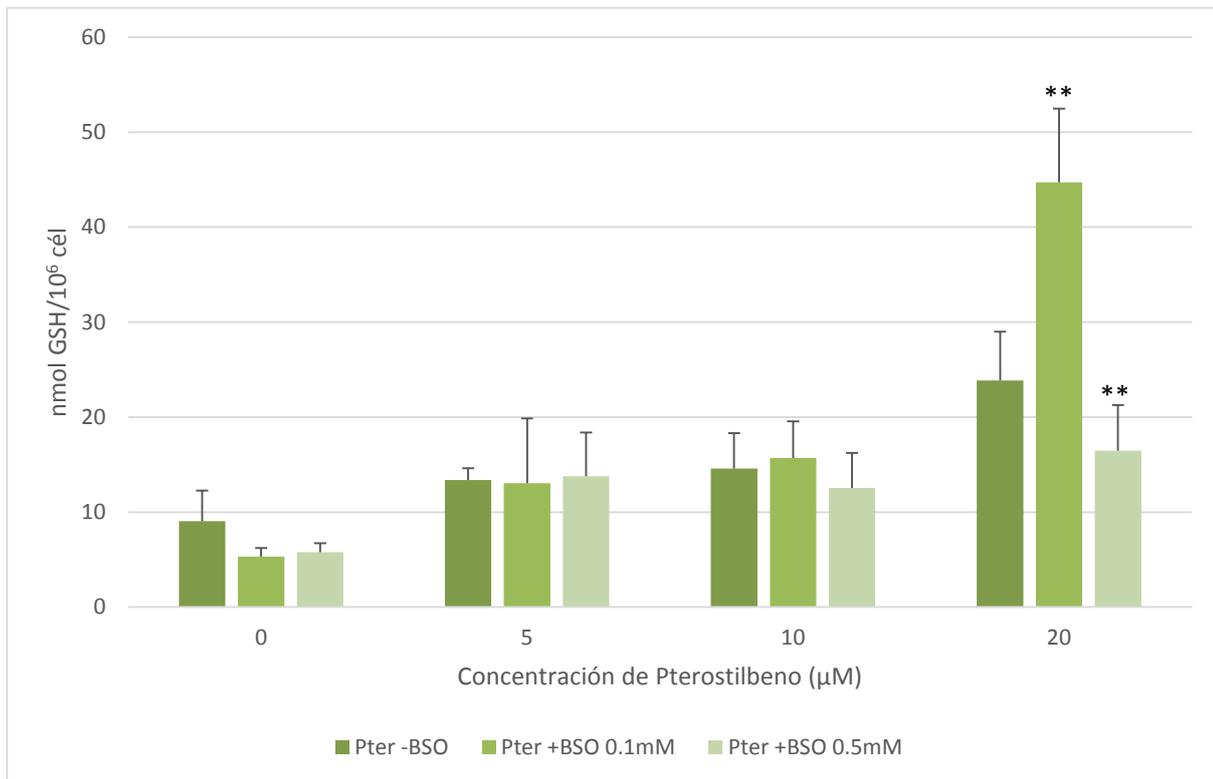
Gráfica V-XLI Efecto del resveratrol sobre las células HT-29 tratadas con BSO

V.8 Depleción de GSH con BSO

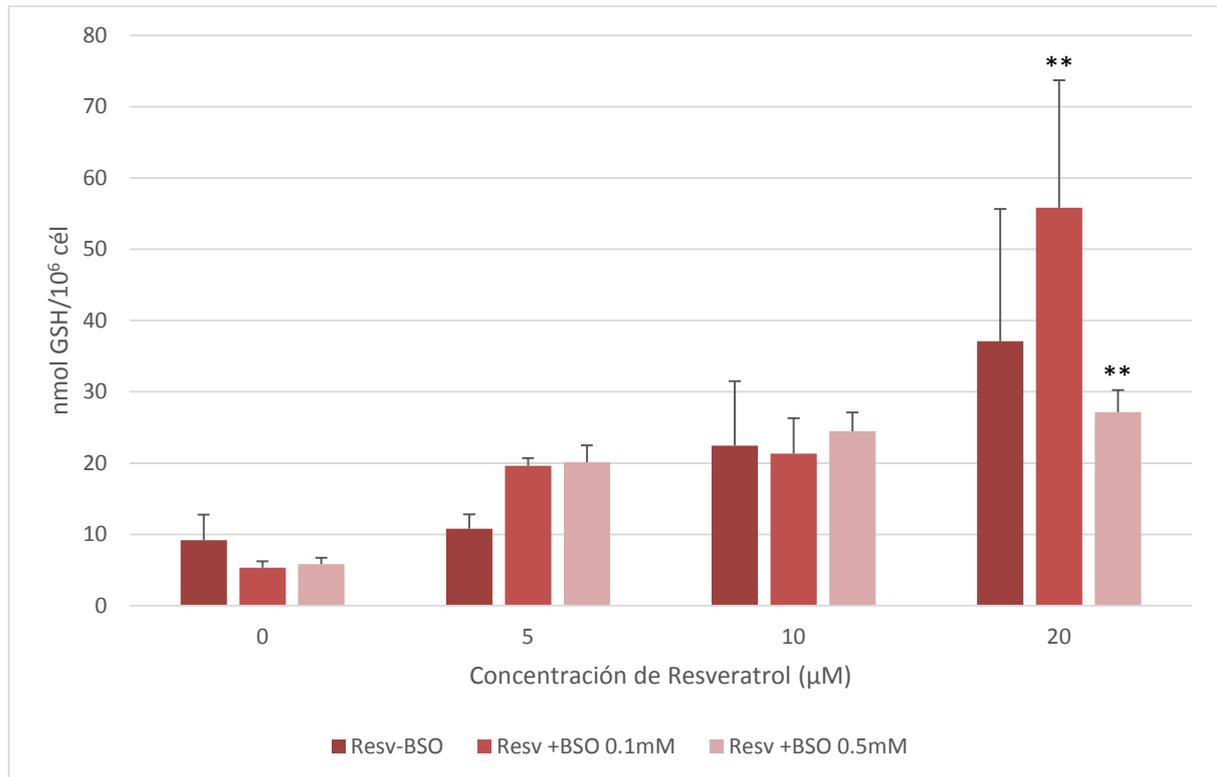
V.8.1 Melanoma (A-375)

Para las células A-375 podemos observar que con una concentración de BSO 0.1 mM no se consigue una depleción completa del GSH, mientras que para una concentración de BSO 0.5 mM podríamos considerar que la depleción del GSH si se ha completado, tanto en el caso del pterostilbeno, como del resveratrol.

La prueba t de Welch encuentra diferencias significativas (** $p < 0.01$) entre las células tratadas únicamente con polifenoles y las células pretratadas con BSO 0.5 mM.



Gráfica V-XLII Niveles de GSH para células A-375 tratadas con BSO y pterostilbeno

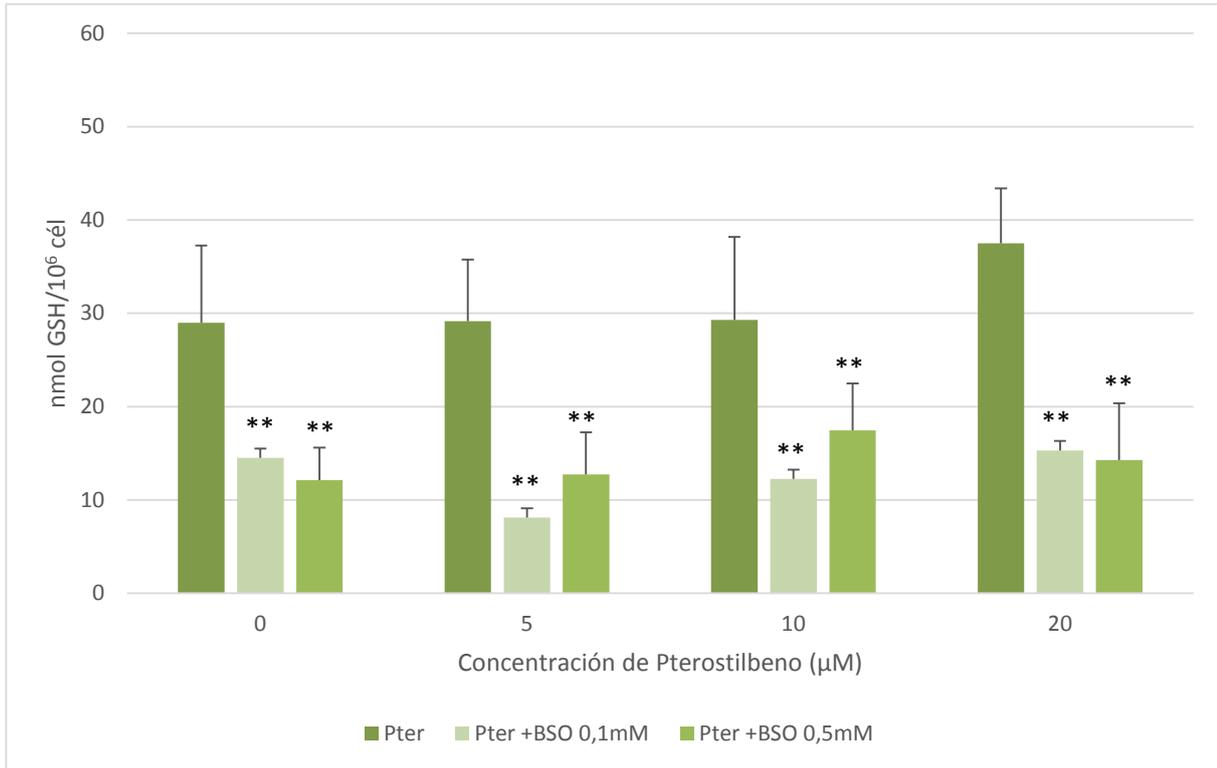


Gráfica V-XLIII Niveles de GSH para células A-375 tratadas con BSO y resveratrol

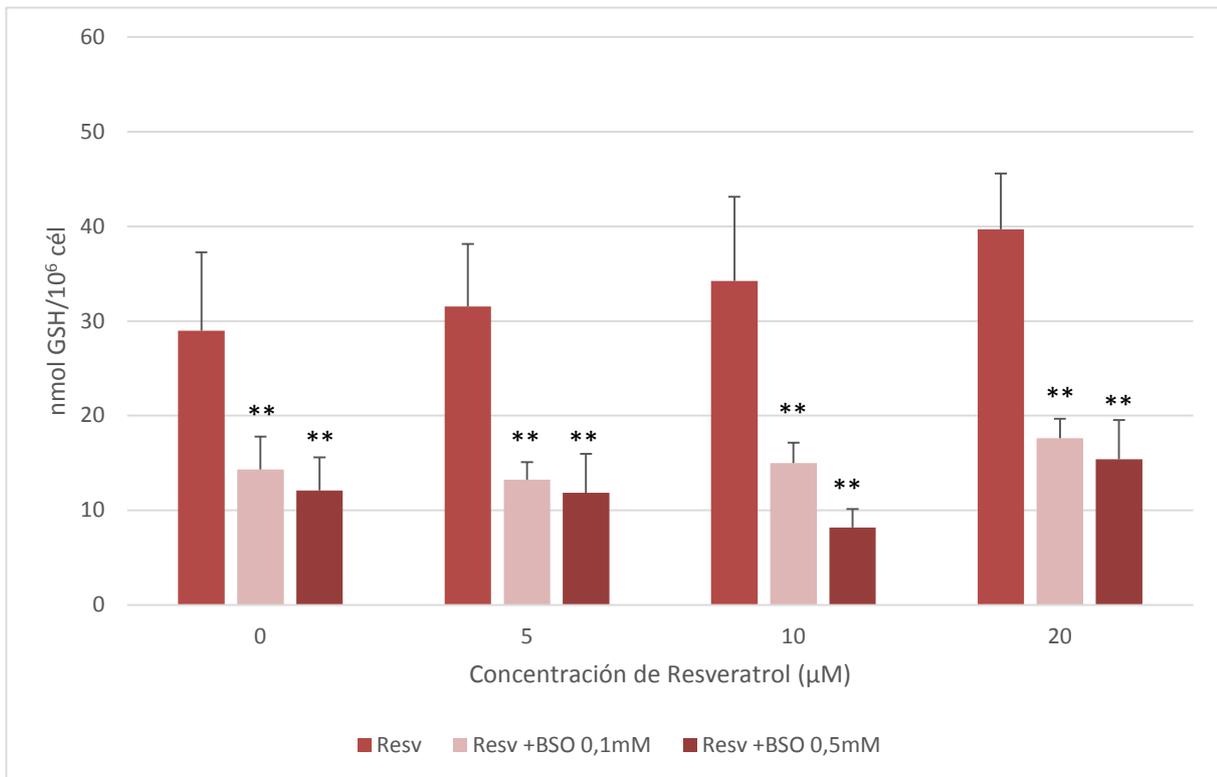
V.8.2 Pulmón (A-549)

A la vista de los resultados obtenidos para las células A-549, podemos considerar que se ha producido la depleción del GSH para los dos polifenoles estudiados. En ambos casos realizamos la prueba t de Welch y obtenemos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones control y las condiciones en presencia de BSO, a concentraciones tanto 0.1 como 0.5 mM.

Observamos que a la concentración de BSO 0.1 mM ya se produce la depleción de GSH, no produciéndose una depleción mayor estadísticamente significativa al incrementar la concentración de BSO.



Gráfica V-XLIV Niveles de GSH para células A-549 tratadas con BSO y pterostilbeno

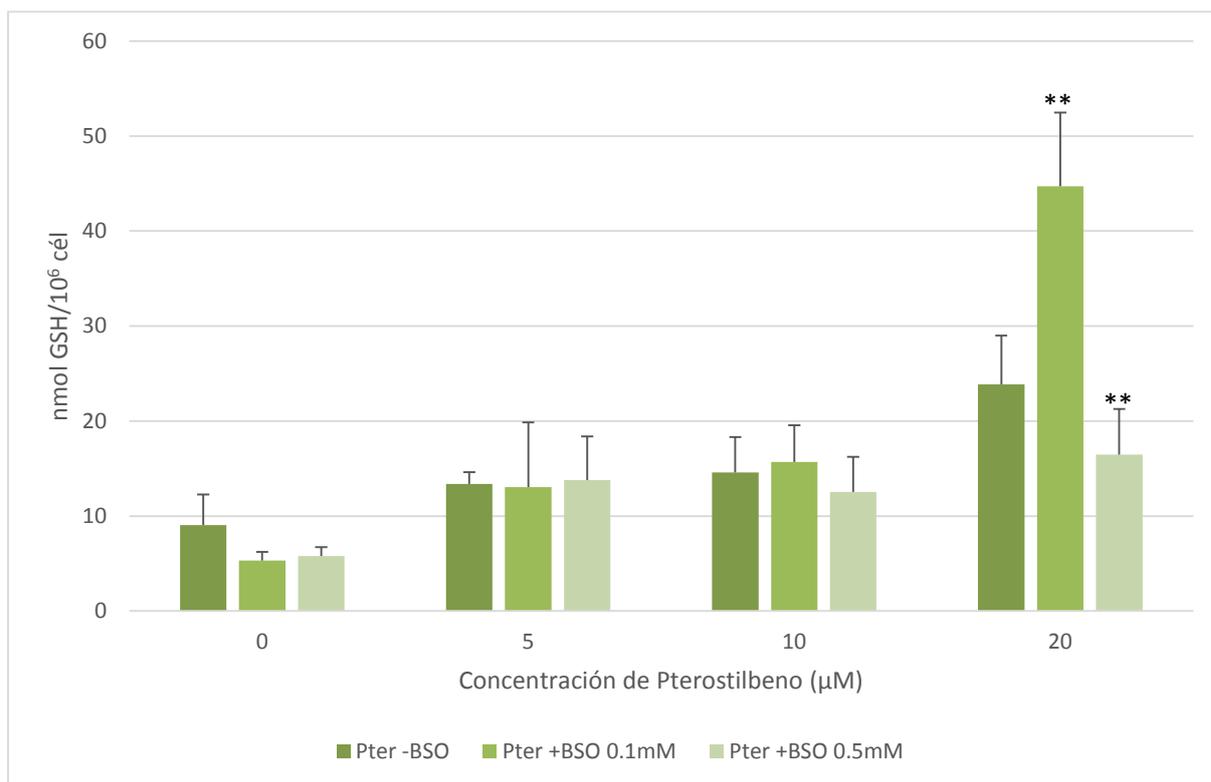


Gráfica V-XLV Niveles de GSH para células A-549 tratadas con BSO y resveratrol

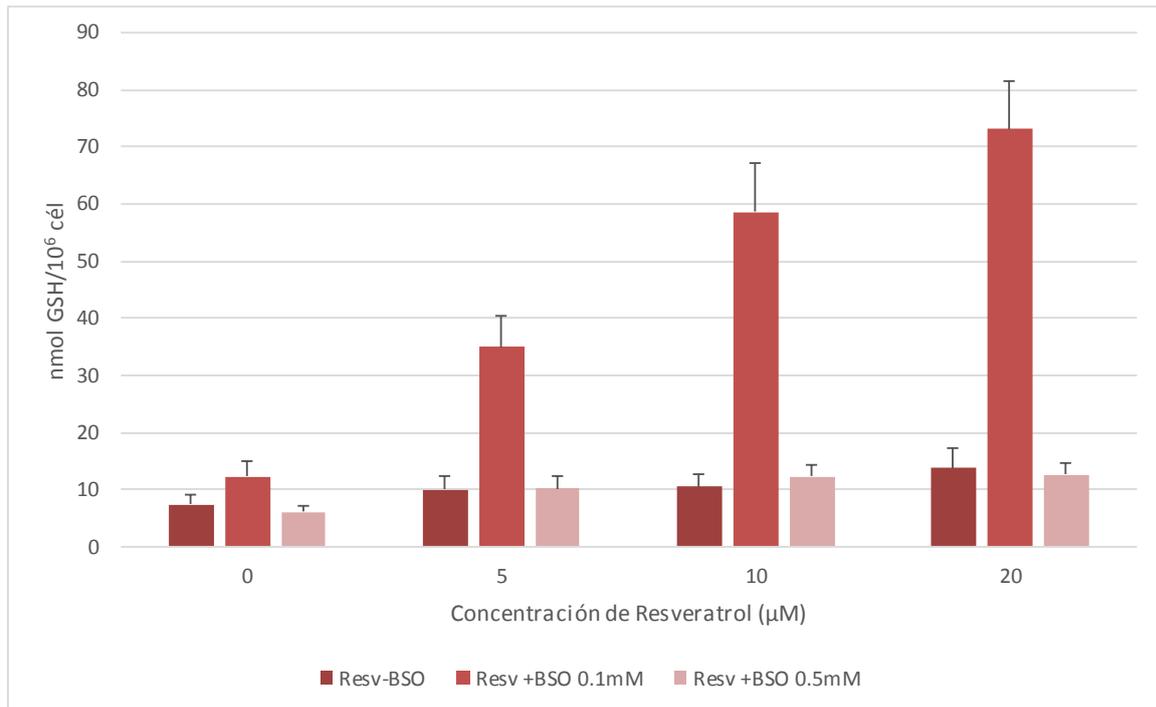
V.8.3 Mama (MCF-7)

Para las células MCF-7 observamos que con una concentración de BSO 0.1 mM no se consigue una depleción completa del GSH, mientras que para una concentración de BSO 0.5 mM podríamos considerar que la depleción del GSH si se ha completado, tanto en el caso del pterostilbeno, como del resveratrol.

La prueba t de Welch encuentra diferencias significativas (** $p < 0.01$) entre las células tratadas únicamente con polifenoles y las células pretratadas con BSO 0.5 mM a concentración de pterostilbeno de 20 μM . En el caso del resveratrol, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica V-XLVI Niveles de GSH para células MCF-7 tratadas con BSO y pterostilbeno

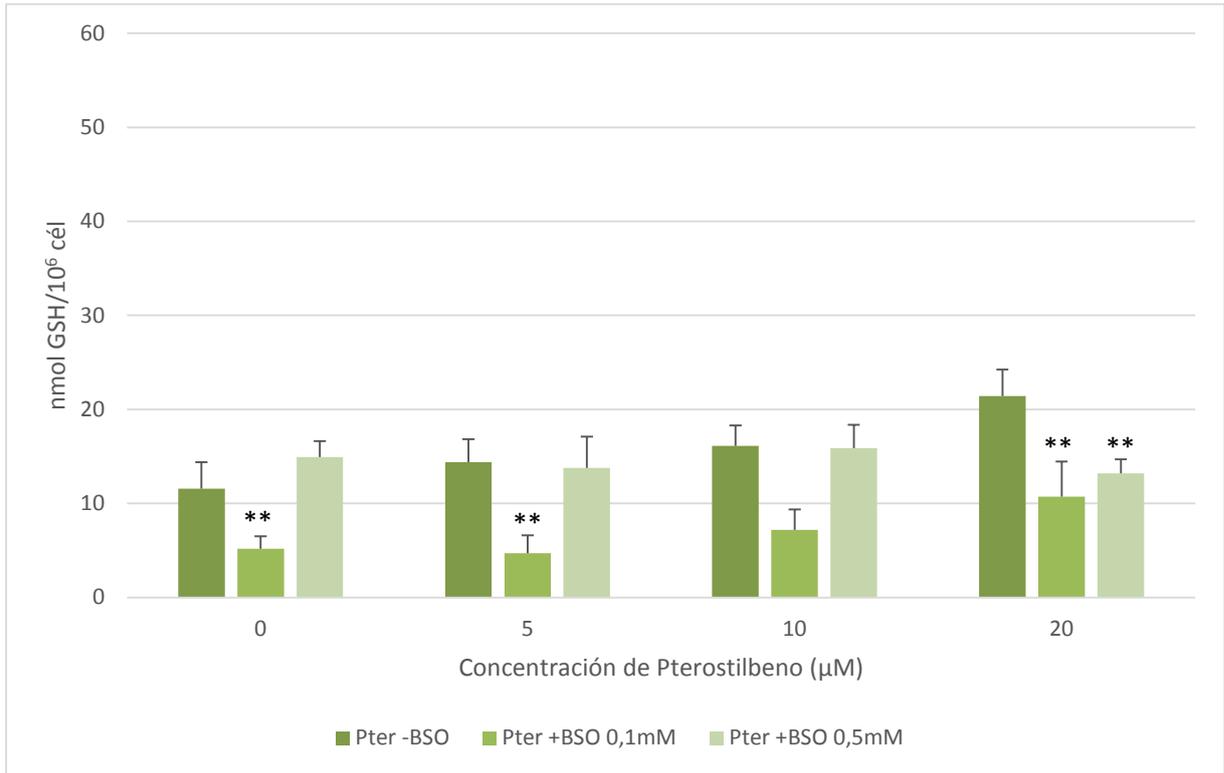


Gráfica V-XLVII Niveles de GSH para células MCF-7 tratadas con BSO y resveratrol

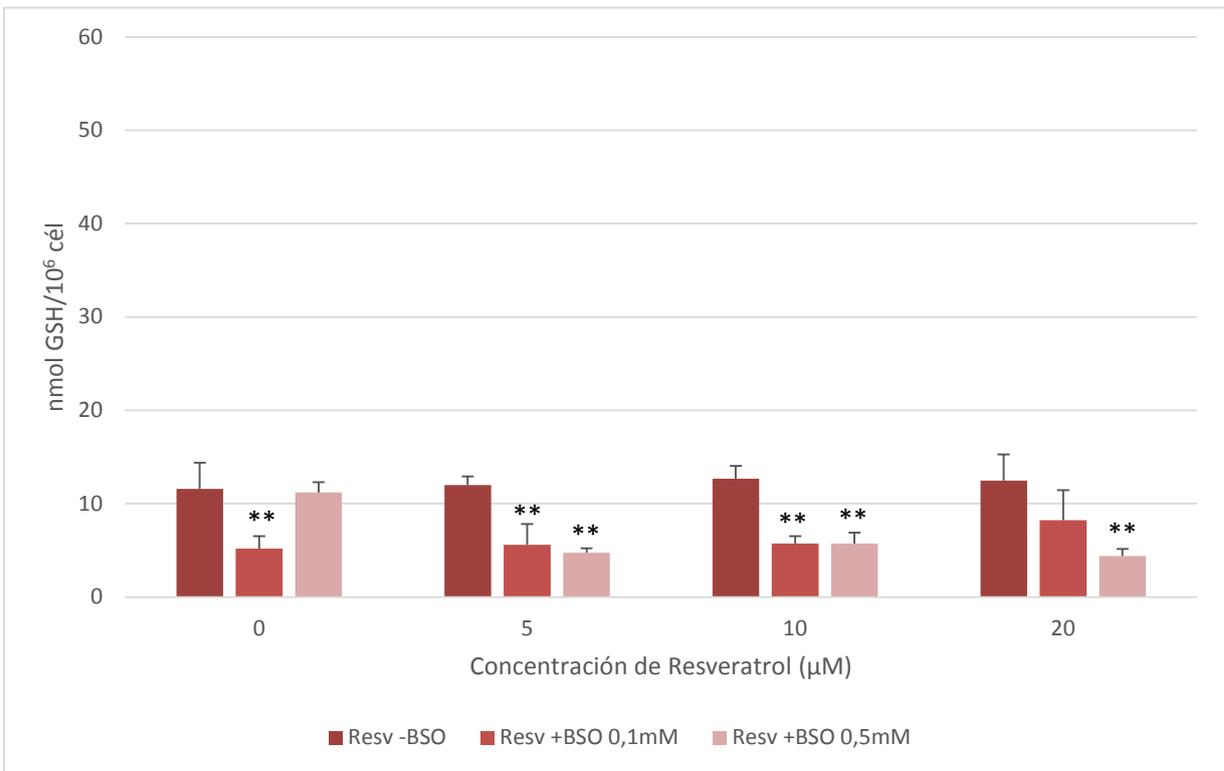
V.8.4 Colon (HT-29)

Por último, en las células HT-29 podemos observar que con la adición de BSO 0.1 mM ya se produce la depleción completa del GSH.

La prueba t de Welch muestra diferencias significativas (** $p < 0.01$) entre las condiciones control y las condiciones en presencia de BSO, a concentraciones tanto 0.1 como 0.5 mM para ambos polifenoles, como se detalla en las gráficas V-XLVIII y V-XLIX.



Gráfica V-XLVIII Niveles de GSH para células HT-29 tratadas con BSO y pterostilbene



Gráfica V-XLIX Niveles de GSH para células HT-29 tratadas con BSO y resveratrol

Capítulo VI

Discusión de resultados

VI.1 Efecto antioxidante del resveratrol en células 3T3

Como ya hemos comentado en la introducción, el tBOOH es un peróxido orgánico generador de estrés oxidativo, lo que nos permite utilizarlo como modelo experimental para evaluar el efecto citoprotector de diversos agentes antioxidantes, en nuestro caso el resveratrol.

En primer lugar, hemos valorado el daño celular producido por el oxidante mediante los marcadores de estrés oxidativo mencionados (8-oxo-dG, MDA, GSH, GSSG), cada uno asociado a un parámetro de interés concreto. En segundo lugar, valoramos el efecto antioxidante del resveratrol para cada uno de estos parámetros. En todos los casos se observa claramente una protección frente a la oxidación de moléculas orgánicas por parte del resveratrol, resultados que concuerdan con los presentes en la literatura [276], [277].

Como hemos mencionado en la introducción, c-fos y c-jun dimerizan para formar el factor de transcripción AP-1 y están implicados en diversas cascadas de transducción de señales relacionadas con el crecimiento, la diferenciación y el estrés celular entre otras funciones. Tanto C-fos como C-jun pueden inducirse rápidamente en respuesta a diversos estímulos, entre ellos el estrés oxidativo. La expresión continuada de cualquiera de ellos puede llevar a la transformación de fibroblastos en cultivo y a la inducción de tumores murinos [34], [275], [278].

Por otra parte, se ha descrito el uso de antioxidantes como la curcumina o la epigallocatequina-3 galato (EGCG) como inhibidores de la activación de c-jun y c-fos [279]–[282], de modo que pueden impedir el crecimiento y transformación de las células tumorales.

También el estado redox del GSH afecta a la activación de c-jun y c-fos. En líneas de fibrosarcoma murino que presentan niveles de GSH muy elevados, se ha observado una gran resistencia a la apoptosis inducida por el t-BOOH así como inhibición en la transcripción de c-fos [274], [275]. Estos datos sugieren que disminuir los niveles de GSH podría contribuir a inducir la apoptosis en células tumorales.

Al tratar las células con distintas concentraciones de t-BOOH observamos una disminución significativa en los niveles de GSH, acompañada de aumento en los niveles de GSSG, por lo que se produce un aumento en la relación GSSG/GSH. También observamos daño en el ADN como reflejan los elevados niveles de 8-oxo-dG y daño lipídico como muestran los niveles de MDA, uno de los productos del proceso de peroxidación lipídica y marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular.

En estudios similares realizados con fibroblastos Balb/c 3T3 por el grupo de Sáez y cols. [274], [275] se obtuvo más de un 10% de células apoptóticas a concentraciones de t-BOOH de 0.125 y 0.250 mM. Observaron que t-BOOH induce la transcripción de c-fos y c-jun de manera concentración-dependiente y que el uso de distintos antioxidantes reducía significativamente la transcripción de ambos, siendo especialmente efectivos la SOD y la tiourea.

En lo referente al daño al ADN, podemos observar como en la incubación con tBOOH 25 μ M aumenta los niveles de 8-oxo-dG de 2.94 8-oxo-dG/10⁶ dG en el control a 3.75 8-oxo-dG/10⁶ dG en la incubación con tBOOH, mientras que las incubaciones realizadas con las células pretratadas con resveratrol recuperan en ambos casos los niveles de 8-oxo-dG e incluso son ligeramente inferiores. El mismo efecto vemos a concentraciones de tBOOH 50 μ M, donde encontramos diferencias estadísticamente significativas en la comparación tanto entre el grupo control frente a la incubación con tBOOH 50 μ M, como entre las incubaciones con tBOOH 50 μ M y pretratadas con resveratrol frente a la incubación sólo con tBOOH 50 μ M, mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las células pretratadas con resveratrol y posteriormente con tBOOH 50 μ M y el grupo control, por lo que podemos decir que prácticamente no ha habido oxidación.

En cuanto a la oxidación lipídica, podemos observar el efecto protector del resveratrol por ejemplo en la incubación con tBOOH 25 μ M y con el resveratrol todavía presente en el medio. En este caso, al incubar sólo con el tBOOH los niveles de MDA aumentan de 0.103 nmoles/mg a 0.156 nmoles/mg, mientras que al incubar con tBOOH en presencia de resveratrol, los niveles de MDA permanecen prácticamente inalterados (0.116 nmoles/mg). En cambio, al eliminar el resveratrol del medio de cultivo tras la preincubación, parte de su efecto protector desaparece, alcanzando los niveles de MDA los 0.128 nmoles/mg. Este efecto se ve incrementado a media que aumentamos la concentración de tBOOH en el medio, de modo que a concentraciones de tBOOH de 100 μ M obtenemos diferencias estadísticamente significativas entre las células incubadas sólo con tBOOH 100 μ M y las células incubadas con resveratrol + tBOOH 100 μ M a las 24 ($p < 0.01$) y a las 28 horas ($p < 0.001$).

Por otra parte, podemos observar que los niveles de GSH en presencia de tBOOH disminuyen considerablemente y por tanto, aumentan los niveles de GSSG en la medida que el GSH se va oxidando, pero al ser preincubadas con resveratrol la oxidación de GSH a GSSG se produce en mucha menor medida, encontrando sólo diferencias significativas con el control en las condiciones resveratrol + tBOOH 50 μ M y resveratrol + tBOOH 100 μ M a las 24 horas, donde los niveles disminuyen de 27.8 nmoles/mg proteína a 21.0 y 20.8 nmoles/mg respectivamente. Esto nos lleva a pensar que el efecto protector aumenta al prolongar la exposición de las células al antioxidante.

VI.2 Efecto de los polifenoles y de la BSO sobre la proliferación tumoral in vitro

Ante los resultados presentados, podemos observar de manera general un claro descenso en el número de células proporcional a la concentración de polifenol presente en el medio de incubación. Este efecto depende del tiempo, siendo mayor a periodos de incubación más largos. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en experimentos similares presentes en la bibliografía [221], [283]–[285].

Al deplecionar el GSH mediante la adición de BSO observamos una mejora en la acción antiproliferativa del polifenol sobre las células tumorales. La L-butionina-[S,R]-sulfoximina es un potente inhibidor de la γ -GCS, enzima limitante de la síntesis de GSH. El efecto deplecionador efectivo se produce a las 72 horas desde la adición, que es el tiempo necesario para que se agote por completo la reserva intracelular de GSH. En estas condiciones, el efecto inhibitor sobre el crecimiento de las células se ve aumentado. Esto puede atribuirse a un incremento de la respuesta apoptótica en estas células en ausencia de GSH.

El pterostilbeno parece ser más efectivo en todas las líneas estudiadas, especialmente en el caso de células de melanoma (A-375).

VI.2.1 Melanoma (A-375)

En el caso de las células de melanoma, los tres polifenoles estudiados son capaces de hacer descender el número de células presentes en cultivo. A mayor concentración de polifenol y mayor tiempo transcurrido, menor es el número de células vivas, llegando a alcanzar valores inferiores al 6% trascurridas 96 horas desde la siembra a concentraciones de 50 μ M. Este efecto sugiere que el polifenol presenta un potencial antitumoral considerable.

Por otra parte, al deplecionar el GSH mediante la adición de BSO, podemos apreciar a las 72 horas de incubación, una disminución de casi un 80% frente al control para el caso del pterostilbeno 5 μ M con BSO 0.5 mM, mientras que la adición de sólo pterostilbeno 5 μ M produce un descenso de en torno al 30%. En el caso del resveratrol, a 5 μ M el descenso es aproximadamente el mismo, pero a concentraciones superiores presenta un mejor resultado, como se muestra en la Gráfica V-C.

Podemos encontrar diversos estudios referentes al uso del resveratrol en células A-375. Por ejemplo, Niles y cols. [283] que obtienen unos resultados similares a los nuestros y sugieren que la muerte celular se produce principalmente por apoptosis y que las células de melanoma A-375 en concreto, al ser amelanóticas, podrían estar especialmente sensibilizadas a la acción del resveratrol.

Por otra parte, para el uso de quercetina sólo hemos encontrado un artículo publicado recientemente por Cao y cols. [286] donde concluyen que la quercetina posee propiedades antiproliferativas además de una elevada citotoxicidad sobre las células A-375 e induce apoptosis.

No hemos encontrado literatura referente al uso del pterostilbeno en células A-375 a excepción de la publicada por el grupo de Estrela [221], donde los resultados son concordantes con los expuestos en esta tesis.

VI.2.2 Pulmón (A-549)

En el caso de las células de pulmón, la disminución que se produce al añadir los tres polifenoles estudiados es menor que en el caso del melanoma. Para el pterostilbeno se produce una disminución más progresiva en todas las concentraciones, mientras que para los otros dos la disminución se ve más pronunciada a altas concentraciones, especialmente a 96 horas de incubación.

Al añadir BSO, observamos para el pterostilbeno una disminución prácticamente lineal, alcanzando a 20 μM casi un 80% de disminución respecto al control en lugar de un 55% sólo con pterostilbeno, mientras que el resveratrol disminuye más bruscamente para 5 μM (disminuye un 55% mientras que el pterostilbeno disminuye un 30% a esa misma concentración) y después continua disminuyendo de manera menos pronunciada hasta eliminar un 70% de células en cultivo, en lugar de un 55% sólo con resveratrol.

En lo referente al estudio del resveratrol en células A-549, podemos mencionar al equipo de Zhang [287], que obtienen a 50 μM una supervivencia celular de un 70% a 48 horas de incubación y de 50% a 72 horas. Destacar que en su estudio concluyeron que la muerte celular inducida por el resveratrol no era debido a un mecanismo de apoptosis, sino a un mecanismo de autofagia.

Para el pterostilbeno, al igual que en el caso de las células A-375, no hemos encontrado literatura referente su uso a excepción de la publicada por el grupo de Estrela [221], donde nuevamente los resultados concuerdan con los que hemos obtenido.

Por último, para el caso de la quercetina, hemos encontrado varios estudios disponibles [288], [289], pero no hemos podido extraer datos suficientes para hacer una comparación.

VI.2.3 Mama (MCF-7)

Al igual que en los casos anteriores, para las células de mama (MCF-7), los tres polifenoles son capaces de reducir el número de células en cultivo de forma significativa. Para el pterostilbeno, se produce la mayor disminución, llegando a ser del 79%. Por su parte, la quercetina presenta una reducción del 68%, que se alcanza a las 72 horas desde la siembra. En el caso del resveratrol, observamos sólo una disminución celular del 50%.

La adición de BSO provoca mayor muerte celular, llegando a obtener para el pterostilbeno con 0.5 mM de BSO un 30% de células vivas frente al 45% que permanecen vivas sólo con la adición de pterostilbeno. Para el caso del resveratrol, tras la adición de BSO, ya sea a concentraciones de 0.1 mM o de 0.5 mM, obtenemos también en torno a un 30% de células vivas frente al casi 60% que permanecen vivas adicionando sólo resveratrol.

En este caso, la literatura disponible es escasa. Podemos citar Kim y cols. [290], que incubando con resveratrol con unas condiciones similares a las nuestras, a 72 horas de incubación y 25 μM obtienen un 45% de células vivas y a 50 μM un 40%, datos que se aproximan notablemente a los que nosotros hemos obtenido. Por otra parte, el equipo de Pozo-Guisado [291], [292] también ha realizado varios estudios con células MCF-7 y resveratrol, pero utilizan otras condiciones de ensayo, por lo que sólo podemos extraer que, en efecto, el resveratrol tiene efecto antiproliferativo sobre las células MCF-7 y que

induce apoptosis de manera dependiente con la concentración, llegando a alcanzar un 40% a 200 μM y 36 horas de incubación.

El equipo de Wang [293] sugiere que en el caso del pterostilbeno, además de inducir apoptosis podría estar presente un mecanismo de autofagia. En cuanto a resultados, están en concordancia con los que hemos obtenido. También están en concordancia los resultados obtenidos por Alosi y cols. [294] donde a las 48 horas de incubación con pterostilbeno 50 μM ya obtenemos una reducción del 50% en el crecimiento celular.

Para la quercetina, podemos citar los estudios de Duo y cols. [295] y de Chou y cols. [296] que observan efecto apoptótico y antiproliferativo en células MCF-7, aunque nosotros obtenemos una mayor disminución en el número de células vivas, pero podría deberse simplemente a que ambos grupos han utilizado otros bancos de suministro de la línea y no han utilizado las mismas condiciones que nosotros en sus ensayos.

VI.2.4 Colon (HT-29)

Por último, en las células de colon, los tres polifenoles estudiados son capaces de disminuir el número de células en cultivo, siendo el pterostilbeno el único que sigue una tendencia de disminución progresiva, presentando un 28% de células vivas en cultivo a concentración 50 μM y transcurridas 96 horas desde la siembra. En el caso de la quercetina, continúan vivas el 34% de las células y en el caso del resveratrol, el 56% de la población celular.

Podemos observar como, para esta línea, se produce una menor muerte celular con respecto al resto de líneas estudiadas. En el caso del pterostilbeno podemos ver que la diferencia entre las distintas concentraciones de BSO es mínima y que los porcentajes de células vivas se sitúan en torno a un 40% para el grupo tratado únicamente con pterostilbeno, mientras que para el pterostilbeno en presencia de BSO se alcanza un porcentaje ligeramente inferior al 30%. Para el resveratrol vemos como la diferencia entre el grupo control y el grupo con BSO 0.5 mM es de un 15%, alcanzando un porcentaje de células vivas de en torno al 50% y 35% respectivamente.

Podemos encontrar numerosa literatura referente al estudio del resveratrol en células HT-29. El equipo de Fang [297] realizó un ensayo con el resveratrol, añadiéndolo transcurridas 24 horas desde la siembra, como es nuestro caso, y estudió a 48, 72 y 96 horas el crecimiento celular a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 μM , concluyendo que la muerte celular se produce de forma dosis y tiempo-dependiente. Por otra parte, mediante citometría de flujo observaron la presencia de cuerpos apoptóticos (a concentración de 50 μM , la presencia de cuerpos apoptóticos era inferior al 15%) y mediante western blot, estudiaron la fosforilación de la PKC α , que aumentaba en función del tiempo transcurrido y la concentración de polifenol añadida, sugiriendo que la activación de la misma está relacionada con la inducción de apoptosis por parte del resveratrol.

Para concentraciones inferiores a 50 μM , hemos encontrado resultados contradictorios. Por una parte, el equipo de Hope [298] no encontró una disminución de la proliferación celular al añadir resveratrol en un rango de concentraciones entre 2.5 y 40 μM tras 48 horas de incubación con resveratrol, añadido

éste en el momento de la siembra; mientras que Fuggetta y cols. [285] estudiaron el efecto del resveratrol sobre el crecimiento celular a concentraciones de 5, 10, 20 y 40 μM y a tiempos de incubación de 48, 72 y 96 horas. A 40 μM y 96 horas de incubación, el número de células se había reducido en más de un 90%. Además observaron una disminución de la actividad de la telomerasa en relación inversamente proporcional a la concentración de resveratrol y al tiempo transcurrido.

Como último ejemplo, el grupo de Juan y cols. [299] que obtuvieron una inhibición del 50% a una concentración de aproximadamente 80 μM a las 96 horas de incubación. Mediante la actividad de la caspasa 3 vieron que se producía apoptosis en las células tumorales, y que la incubación con resveratrol durante 3 horas a concentraciones entre 1 y 400 μM no producía citotoxicidad.

En lo referente al pterostilbino, Paul y cols. [300] realizaron un ensayo comparativo con resveratrol y pterostilbino y concluyeron que el pterostilbino producía el mismo efecto que el resveratrol con la mitad de dosis. Este resultado concuerda con el que hemos obtenido nosotros, en el que a concentración 50 μM , el pterostilbino presenta un 28% de células que permanecen vivas, mientras que la misma concentración de resveratrol muestra un 56%.

En cuanto al estudio de la quercetina, no hemos encontrado mucha información en la literatura, pero citaremos dos ensayos *in vitro* bastante recientes que concuerdan con la actividad apoptótica y antiproliferativa que hemos descrito [301], [302]. No podemos realizar una mayor comparación de resultados, puesto que emplean células obtenidas en otros bancos y condiciones de ensayo distintas de las nuestras, además de concentraciones superiores a 50 μM .

VI.3 Análisis de muerte celular y de la distribución de las fases del ciclo celular

Como podemos observar en los resultados obtenidos, la adición de resveratrol y pterostilbino produce un descenso significativo de la viabilidad celular en las distintas líneas tumorales (en torno a un 40% en las células A-375, un 30% en A-549 y un 35% en células MCF-7) a excepción de la línea HT-29, cuyo descenso se limita a un 7-8%.

En cuanto al origen de la muerte celular, podemos observar un predominio de muerte por necrosis en los controles, mientras que observamos un predominio de muerte por apoptosis en las células tratadas con polifenol. Para las células A-375 y A-549 observamos aproximadamente un 70% y 60% respectivamente de células apoptóticas frente al 35% y 40% de los grupos control; en el caso de las células MCF-7 podríamos decir que el porcentaje es el mismo para células necróticas y apoptóticas (50%) al incubarse con polifenoles, mientras que en el control encontramos un 25% de células apoptóticas. Mientras que en la línea HT-29 el predominio es claramente necrótico (75% de las células no viables) y ligeramente superior al 70% de células necróticas en el control.

Si observamos las tablas detalladamente, el pterostilbino produce un mayor efecto apoptótico que el resveratrol (un 7% superior para A-375, un 14% para A-549 y un 5% para células MCF-7) mientras que para las células HT-29 la diferencia es de un 2% superior a favor del resveratrol.

Como hemos comentado en la introducción, la apoptosis se desencadena con una permeabilización de la membrana mitocondrial que libera una serie de proteínas que activan la cascada de caspasas, activando la apoptosis por una de las dos vías: la extrínseca, donde el receptor Fas se asocia a FADD y a la procaspasa 8 formando el DISC y activando la procaspasa 8 que a su vez activa las procaspasas 3, 6 y 7 que coordinan la muerte celular. En la vía intrínseca, la permeabilización de la membrana a iones como el Ca^{2+} conduce a una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), despolarizando la membrana y desacoplando la cadena respiratoria. Esto lleva a activación de la cascada de caspasas y la liberación del citocromo c, controlada por las proteínas de la familia Bcl-2.

El proceso de necrosis se produce también por una permeabilización de la membrana mitocondrial. La célula aumenta su volumen debido a que el mPTP permanece abierto, permitiendo la rápida entrada de agua e iones, se produce la caída del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ y la rotura de la membrana plasmática.

Queda por dilucidar el mecanismo molecular de actuación de los polifenoles estudiados en las distintas líneas tumorales. En general, los mecanismos moleculares que subyacen bajo los efectos anticancerígenos de los polifenoles naturales están todavía por definir en profundidad. Sobre el resveratrol podemos encontrar numerosas investigaciones en la literatura donde además de tener efecto antiproliferativo, ha demostrado ser un potente inductor de apoptosis y autofagia; pero su análogo dimetilado, el pterostilbeno, todavía no ha sido estudiado en profundidad.

El grupo de Kim y cols. [303] estudió el efecto del resveratrol en células A-375 y, debido a la capacidad del resveratrol de estimular la producción de NO en determinados tipos celulares, el papel que el NO desarrolla en la inhibición del crecimiento celular y la promoción de la apoptosis. Encontraron que tras 48 horas de incubación con resveratrol 50 μM en combinación con capsaicina 100 μM , la producción de NO se incrementaba hasta 40 veces en comparación con los controles. Por otra parte, al tratar las células con resveratrol 50 μM durante 48 horas obtuvieron un 45% de células apoptóticas.

A la vista de estos resultados decidieron investigar los mecanismos moleculares subyacentes. Para ello, analizaron mediante western blot la expresión de proteínas involucradas en las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Pertenecientes a la vía intrínseca, analizaron las proteínas p53, Mdm2, Bax y Bcl-2. Obtuvieron un aumento en los niveles de p53 acompañado de un descenso en los niveles de Mdm2, además de una ligera elevación en los niveles de Bax (proapoptótica) y un descenso en los niveles de Bcl-2 (antiapoptótica). Reguladoras de la vía extrínseca analizaron DR4, Fas y la caspasa 8; observando un incremento en los niveles de DR4 y Fas. Sus hallazgos sugieren que ambas vías puedan estar involucradas en la muerte de las células tratadas.

Adicionalmente, analizaron la expresión del citocromo c y las caspasas 3 y 9. Observaron que el resveratrol producía una liberación del citocromo c en el citosol y la activación de las caspasas 3 y 9. No obstante, no pudieron determinar el papel del NO aunque diversos estudios han mostrado que el NO induce apoptosis dependiente de caspasas por ambas vías.

El equipo de Whyte [304] estudió la muerte inducida por resveratrol en células de pulmón A-549. Observaron que el resveratrol inhibía el crecimiento celular de forma concentración dependiente, notando una inhibición significativa a 25 μ M y 48 horas de incubación. Para estas condiciones, la detención del ciclo se producía en la fase G₁ (distribución de las fases del ciclo celular G₁ 70.2%, S 26.1%, G₂ 3.7% frente a los datos obtenidos para el control: G₁ 50.2%, S 36.2%, G₂ 13.6%), resultados que concuerdan con los que hemos obtenido. Otras investigaciones, por el contrario, han indicado que el resveratrol detiene el ciclo en la fase S o G₂/M [305]. La regulación positiva de p53 y p21 junto con la regulación negativa de ciclina A, CHK1, CDC27 y Eg5 indican que el resveratrol puede tener un papel regulador en las tres fases del ciclo celular. Además, en la literatura se ha descrito que el resveratrol puede afectar a distintas fases del ciclo celular dependiendo de la línea tumoral [207].

En cuanto al estudio de la apoptosis, Whyte y cols. observaron que se producía la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación de la cascada de caspasas. Observaron además, que se producía una alteración en la regulación de las proteínas SMAD, sugiriendo que esto puede llevar al bloqueo de la señalización nuclear en la ruta TGF- β , llevando a la inhibición de la proliferación celular en A-549.

Por su parte, Kim y cols. [305] observaron que el efecto antiproliferativo del resveratrol en células A-549 estaba asociado con la inhibición de la fosforilación de pRb junto con la inducción de p21WAF1/CIP, inhibidor de CDKs, que se regula positivamente y es dependiente de p53. Además, observaron que la apoptosis inducida por el tratamiento con resveratrol estaba relacionada con la activación de la caspasa-3 y un cambio en la relación de Bax/Bcl-xL favoreciendo la apoptosis. El tratamiento con resveratrol también inhibió la actividad transcripcional de NF- κ B.

Hsieh y cols. [306] investigaron la muerte celular inducida por pterostilbena en células A-549. Observaron que la distribución de las fases del ciclo celular era concentración y tiempo dependiente, observando que el tratamiento con pterostilbena producía un aumento en las fases sub-G₁ y G₀/G₁ y un descenso en las fases S y G₂/M en comparación con los controles.

También observaron que se producía la muerte por autofagia en un estado inicial (24 horas post-tratamiento) y posteriormente por apoptosis (48 horas post-tratamiento). Al inhibir la autofagia, aumentó la citotoxicidad del pterostilbena, produciéndose un aumento de la apoptosis. El uso del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no disminuyó la inducción de muerte celular, sugiriendo un mecanismo independiente de caspasas.

Para investigar la ruta de activación de la autofagia, analizaron mediante western blot los niveles de las formas fosforiladas de PI3K, Akt, ERK1/2 y JNK1/2. Observaron que el pterostilbena aumentaba la activación de ERK1/2 de forma concentración dependiente, mientras que disminuía la activación de las demás quinasas. Mediante la inhibición de las distintas quinasas, observaron que la autofagia inducida por pterostilbena estaba mediada por la inhibición de las rutas PI3K/AKT y JNK y la activación de ERK. Sugieren que una combinación de pterostilbena con inhibidores de la autofagia podría aumentar la eficiencia de las estrategias quimioterápicas proapoptóticas tanto en células sensibles como quimioresistentes.

En otros estudios, como en Cecconi y Levine, 2008 [307] se ha sugerido que la inhibición de p53 citosólico induce autofagia, por lo que sería interesante investigar el papel de p53 en la autofagia inducida por pterostilbeno.

Por su parte, el equipo de Pozo-Guisado estudió el mecanismo de apoptosis inducido por el resveratrol en células MCF-7 [292] donde hipotetizaron que este mecanismo podía ser PI3K y NF- κ B dependiente. Observaron que se producía una regulación negativa de Bcl-2, disminuyendo los niveles de proteína de forma concentración dependiente. En cambio, en células MCF-7 con sobreexpresión de Bcl-2 no presentaban niveles indicativos de apoptosis, sugiriendo que la apoptosis inducida por resveratrol está relacionada con los bajos niveles de Bcl-2. El tratamiento con resveratrol inhibió también la actividad en MMP-9 y NF- κ B, involucradas en el control de la migración celular.

El descenso de Bcl-2 no produjo liberación de citocromo c desde la mitocondria, como sucede en otras líneas celulares donde la apoptosis inducida por el resveratrol es dependiente de caspasas. Además, las células MCF-7 carecen de actividad caspasa 3 debido a una mutación puntual, por lo que como alternativa, estudiaron la vía de la caspasa 8, que resultó no estar involucrada tampoco. Para dilucidar el mecanismo independiente de caspasas, decidieron analizar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$, que suelen producirse debido a un aumento de la peroxidación lipídica y a una acumulación de ROS. Observaron un aumento tiempo dependiente de ROS y concentración dependiente de NO en las células tratadas con resveratrol, sugiriendo que el aumento de estrés oxidativo a través del descenso del $\Delta\Psi_m$ y los niveles de Bcl-2 podría estar involucrado en la apoptosis inducida por resveratrol en células MCF-7.

El NO puede inducir apoptosis o necrosis, dependiendo del tipo celular y del estado redox intracelular, actuando como un intercambiador molecular entre los dos procesos. Esto explicaría nuestros resultados de muerte celular, donde para las células MCF-7 tratadas con resveratrol observamos un 48% de células apoptóticas y un 52% de necróticas; resultados bastante similares a los que obtenemos para las células tratadas con pterostilbeno, donde observamos un 53% de células apoptóticas y un 47% de necróticas.

Numerosos estudios sugieren que el resveratrol puede inhibir la activación de NF- κ B y AP-1, así como la activación de JNK y MEK, la apoptosis dependiente de caspasas y la producción de ROI y peroxidación lipídica [308]. Esto último explicaría el mecanismo por el cual el resveratrol ejerce su efecto. Afirman que la concentración de resveratrol presente con el consumo de uvas o vino sería suficiente para notar sus efectos anticancerígenos.

Por otra parte, Paul y cols. [300], como ya hemos comentado, hicieron un estudio comparativo con resveratrol y pterostilbeno. Observaron niveles bajos de c-Myc y ciclina D1 así como niveles elevados de PARP en las células tratadas con pterostilbeno. Además, el pterostilbeno mostró tener un efecto antiinflamatorio superior, inhibiendo la activación de genes como iNOS y COX-2 de forma concentración dependiente así como la activación de la cascada p38 MAPK.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el grupo del Dr. Estrela con células de melanoma B16 [273], [309] así como en las cuatro líneas tumorales estudiadas en esta tesis. En Mena y

cols. [221] estudiaron el efecto del pterostilbeno sobre estas cuatro líneas. Como hemos comentado anteriormente, la muerte celular inducida por el pterostilbeno es tiempo y concentración dependiente. Observaron que la detención del ciclo celular se producía en la fase S para las cuatro líneas celulares a las 24 horas de tratamiento.

Para investigar los mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por el pterostilbeno, se midió la actividad de las caspasas 3 y 7, produciéndose un aumento significativo en ambas actividades tras la adición del mismo en las líneas A-375 y A-549 pero no en MCF-7 y HT-29. Sin embargo, la preincubación con el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no disminuyó la inducción de muerte celular, lo que sugiere que la citotoxicidad inducida por el pterostilbeno puede deberse a un mecanismo independiente de caspasas.

Por ello, estudiaron la implicación de otros mecanismos de muerte celular. Encontraron una acumulación de autofagosomas que apuntaban a la inhibición del flujo autofágico. Por otra parte, estudiaron la integridad de la membrana plasmática midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) citosólica. Se produjo un aumento moderado de necrosis tras el tratamiento con pterostilbeno. La inhibición de la necroptosis (forma de necrosis programada) no afectó a la muerte inducida por pterostilbeno, indicando que éste puede activar otro tipo de muerte celular diferente de la apoptosis, autofagia y necrosis.

VI.4 Efecto de los polifenoles y de la BSO sobre los niveles de GSH

Como ya hemos mencionado, para determinar si existen diferencias significativas en los niveles de GSH para cada uno de los tratamientos (distintas concentraciones) con polifenoles y a distintos tiempos de cultivo, hemos realizado un ANOVA de un factor.

En primer lugar, hemos estudiado los niveles de GSH para la línea celular de melanoma. Los experimentos se realizaron a 48, 72 y 96 horas. A las 48 horas de incubación, se observa un aumento progresivo en los niveles de GSH para el pterostilbeno y la quercetina. Por su parte, el resveratrol presenta un aumento menor a concentraciones de hasta 20 μM , pero con un gran aumento para 50 μM . A las 72 horas, observamos esta misma tendencia en los tres polifenoles, siguiendo la tendencia pareja de crecimiento progresivo para el pterostilbeno y la quercetina, mientras que los niveles de GSH del resveratrol suben muy pronunciadamente. Por último, a las 96 horas, vemos que los tres polifenoles siguen la misma tendencia que en los periodos de incubación anteriores.

De manera general, para el pterostilbeno observamos que a concentraciones de 20 μM , el comportamiento es similar durante todo el tiempo de incubación, produciéndose un aumento muy significativo para la concentración de 50 μM al final del período de incubación. El resveratrol muestra un comportamiento muy similar en los tres tiempos de incubación estudiados, presentando a 50 μM un gran aumento en el nivel de GSH respecto a los valores obtenidos en concentraciones inferiores. En cuanto a la quercetina, vemos que es el polifenol que muestra una mayor variación de su comportamiento en función del tiempo de incubación transcurrido. A tiempos cortos de incubación, el incremento de los niveles de

GSH con el aumento de la concentración de polifenol es muy progresivo, mientras que a tiempos altos, se observa un gran aumento para concentración de 50 μM .

En cuanto a la depleción del GSH, es necesario utilizar una concentración de BSO 0.5 mM para alcanzar una depleción completa, tanto en el caso del pterostilbeno como del resveratrol.

En segundo lugar, se estudiaron los niveles de GSH para la línea celular de pulmón. A 48 horas, podemos observar para los tres polifenoles que los niveles se mantienen aproximadamente iguales para las tres concentraciones estudiadas. A 72 horas de incubación, el pterostilbeno y el resveratrol presentan comportamientos similares, manteniendo los niveles de GSH hasta concentraciones de 20 μM y aumentando significativamente a una concentración de 50 μM . Por su parte, la quercetina prácticamente mantiene los niveles, presentando un ligero aumento a 50 μM . Al final del período de incubación, a 96 horas, se observa que el pterostilbeno presenta un aumento progresivo y significativo conforme aumenta la concentración del polifenol. Para la quercetina y el resveratrol tenemos comportamientos similares entre ambos, presentando unos niveles de GSH similares al control hasta concentraciones de 20 μM , y un aumento muy significativo para 50 μM .

A la vista de los niveles de GSH obtenidos al añadir BSO podemos deducir que la depleción ha sido completa para ambos polifenoles, pterostilbeno y resveratrol.

En tercer lugar, se estudiaron los niveles de GSH para las células de mama. A 48 horas, se observó que tan solo el pterostilbeno mostraba un aumento en los niveles de GSH conforme aumentábamos las concentraciones, y que el resveratrol y la quercetina se mantenían prácticamente en los valores de control. A 72 horas, sí que se observa que los tres polifenoles aumentan progresiva y ligeramente los niveles de GSH, siendo este aumento estadísticamente significativo a 50 μM . A 96 horas, el resveratrol y el pterostilbeno siguen mostrando solo un ligero aumento con la concentración, mientras que para la quercetina sí que se muestra un aumento significativo.

En resumen, para esta línea celular, se observa que el pterostilbeno no muestra un cambio significativo en la tendencia de los niveles de GSH conforme aumentamos el tiempo de incubación y la concentración de polifenol añadida. Por su parte, el resveratrol presenta un ligero aumento en los niveles de GSH a lo largo de todo el período de incubación. Por último, la quercetina sí que muestra un aumento progresivo en los niveles de GSH a lo largo del período de incubación, siendo este muy significativo al alcanzar las 96 horas.

En cuanto a la depleción del GSH, obtenemos que a una concentración de BSO de 0.1 mM no se produce depleción, es necesaria la adición de BSO 0.5 mM, especialmente en el caso del resveratrol.

Por último, se estudió la línea de colon. Para los tres polifenoles observamos un aumento progresivo en los niveles de GSH a las 48 horas de incubación. En 72 horas los tres polifenoles estudiados siguen la misma tendencia de aumento progresivo conforme aumentamos la concentración del polifenol presente en cultivo. A 96 horas, continua la misma tendencia de aumento salvo en el caso del resveratrol. En resumen, podemos decir que la tendencia de aumento de los niveles de GSH con los tres polifenoles

se mantiene similar para todos los períodos de incubación, salvo en el caso del resveratrol que no muestra ningún aumento del nivel para 96 horas de incubación.

En cuanto al tratamiento con BSO, observamos que a la concentración de 0.1 mM ya se produce la depleción del GSH para los dos polifenoles estudiados.

Como hemos comentado anteriormente, el GSH está involucrado tanto en la regulación de la proliferación celular como de la muerte por apoptosis. Es por tanto plausible que los efectos antitumorales de los polifenoles naturales estén relacionados molecularmente con los niveles intracelulares de GSH o, que al menos, la depleción tenga efectos sinérgicos con los inducidos por los polifenoles.

La depleción de GSH como posible estrategia para sensibilizar las células cancerígenas se lleva investigando más de una década. Las células cancerígenas tienden a presentar niveles elevados de GSH intracelular, posiblemente como respuesta adaptativa a un metabolismo más activo y niveles constantes de ROS [310].

La depleción de GSH intracelular puede conseguirse a través de distintos mecanismos, incluyendo: la inhibición de la captación de cisteína, la inhibición de la síntesis de glutación, regulación del flujo de salida mediado por MRP, la oxidación del GSH, y las reacciones de transtiolación que conducen a aductos glutación-proteína.

Aunque se ha observado que los flavonoides son capaces de inducir depleción de GSH, su habilidad varía drásticamente de un tipo de cáncer a otro. Además, una variedad de compuestos naturales inducen apoptosis en células cancerígenas aumentando la producción mitocondrial de ROS seguida de la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c. Aunque el mecanismo exacto por el cual las ROS inducen la formación de poros todavía es objeto de estudio, la sobreproducción de ROS como evento central en la apoptosis por vía mitocondrial ha sido bien descrito.

Muchos polifenoles tienen propiedades antioxidantes y pueden reaccionar directamente con las ROS/RNS, formando productos mucho menos reactivos. Los compuestos presentes en una dieta rica en vegetales pueden aumentar la capacidad de las defensas antioxidantes endógenas y modular el estado redox celular, que a través de la regulación de las vías de señalización, puede tener grandes consecuencias sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Además, se ha descrito que los polifenoles modulan la actividad de las proteínas quinasas, actúan como ligandos para factores de transcripción y modulan la actividad de las proteasas [311].

El glutación se encuentra en concentraciones milimolares en la mayoría de las células y es el principal contribuyente al estado redox de la célula. Es sintetizado enzimáticamente por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) y la glutación sintetasa (GS), siendo la γ -GCS la enzima limitante de la velocidad. Se ha observado que concentraciones relativamente bajas de polifenoles pueden aumentar la actividad de la γ -GCS mediante la transactivación de la subunidad catalítica γ -GCS_h [311], [312]. Estos resultados se corresponden con el aumento de actividad γ -GCS que nosotros hemos observado en el tratamiento de las células cancerígenas con resveratrol y pterostilbeno.

Por otra parte, en experimentos realizados *in vivo* con dietas ricas en polifenoles observaron grandes diferencias en la actividad promotora de γ -GCSH entre animales. Una posible explicación podría estar relacionada con la biotransformación de los polifenoles debido a la composición única de la microbiota intestinal y su interacción con los mismos, variando la biodisponibilidad y bioactividad de éstos en cada animal.

Además, nos encontramos con otra gran limitación en el tratamiento del cáncer: la estrecha ventana terapéutica entre la dosis de fármaco que puede matar a la célula cancerígena y la que puede producir toxicidad adversa en el paciente [313]. Aunque las dosis de polifenoles que ingerimos en la dieta son inocuos, se han producido algunos casos de toxicidad severa asociada al consumo de polifenoles [314]. Dos casos destacables han estado relacionados con el consumo de quercetina y de polifenoles presentes en el té verde en estudios clínicos.

Esto nos lleva a reflexionar sobre los efectos que altas concentraciones de polifenoles pueden tener sobre el organismo. Los flavonoides a altas concentraciones producen radicales reactivos a través de la auto-oxidación y el aumento del estallido respiratorio mitocondrial. A pesar de los potenciales redox de la mayoría de los radicales flavonoides son inferiores a los de los radicales $O_2^{\bullet-}$ y ROO^{\bullet} , la eficacia de los radicales para generar peroxidación lipídica, daño en el ADN y mutaciones podría ser significativa en el desarrollo de enfermedad. Además, se ha observado que algunos flavonoides inhiben enzimas (como las topoisomerasas) involucradas en la estructura del ADN y su replicación, y se ha sugerido que la alta ingesta de flavonoides predispone al desarrollo de ciertas leucemias infantiles [315], [316]. Por otra parte, la alteración del glutatión con la importancia que posee en la regulación redox de las funciones celulares puede inadecuarlo como posible diana terapéutica.

Si bien es cierto que todavía queda por determinar si los polifenoles ingeridos en la dieta modulan las concentraciones de glutatión celular en los seres humanos y si contribuyen a la regulación de las principales vías de señalización celular, contribuyendo así a la protección contra enfermedades, la recomendación general es de incrementar el consumo de frutas y verduras.

Capítulo VII

Conclusiones

- El resveratrol, como ejemplo de estilbeno natural, tiene efecto protector frente al estrés oxidativo inducido en condiciones *in vitro*.
- La depleción selectiva de GSH, inducida por un inhibidor específico de su síntesis (la BSO), potencia el efecto antitumoral citotóxico de los estilbenos naturales.
- El pterostilbeno parece tener un mayor efecto anticancerígeno que el resveratrol en la mayoría de las líneas tumorales aquí estudiadas, y su mayor biodisponibilidad le confiere una clara ventaja para su aplicación en la terapia oncológica.
- Proponemos la posibilidad del uso combinado de estilbenos naturales y depleción de GSH como terapia coadyuvante contra el cáncer. Al efecto de potenciar la eficacia de diferentes terapias convencionales.

Bibliografía

- [1] "¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?," *SEOM*, Abril-2013. [Online]. Available: <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>.
- [2] "Cáncer, Nota descriptiva N° 297," *OMS*, Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. [Accessed: 31-Jul-2013].
- [3] E. Regidor and J. L. Gutiérrez-Fisac, "Patrones de Mortalidad en España, 2010." Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013.
- [4] W. S. Klug, M. R. Cummings, C. A. Spencer, and M. A. Palladino, *Concepts of Genetics*, 10th Edition. Pearson Education, 2012.
- [5] A. Blasco, C. Caballero, and C. Camps, "Deterioro cognitivo asociado al tratamiento oncológico," *Cuad. Monográficos Psicobioquímica*, vol. 2, pp. 26–36, Jul. 2013.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [7] M. Shawi and C. Autexier, "Telomerase, senescence and ageing," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 1–2, pp. 3–10, Enero 2008.
- [8] M. Papetti and I. M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 282, no. 5, pp. C947–C970, May 2002.
- [9] A. F. Chambers, A. C. Groom, and I. C. MacDonald, "Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 563–572, Aug. 2002.
- [10] S. Paget, "The distribution of secondary growths in cancer of the breast," *The Lancet*, vol. 133, no. 3421, pp. 571–573, Mar. 1889.
- [11] I. J. Fidler, "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 453–458, Jun. 2003.
- [12] J. Ewing, "Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours," *Br. J. Surg.*, vol. 16, no. 61, pp. 174–175, 1928.

- [13] L. Weiss, "Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 10, no. 3, pp. 191–199, May 1992.
- [14] H. S. N. Greene and E. K. Harvey, "The Relationship between the Dissemination of Tumor Cells and the Distribution of Metastases," *Cancer Res.*, vol. 24, no. 5, pp. 799–811, Jun. 1964.
- [15] C. Román Curto, "El proceso metastásico I: Invasión local de la matriz extracelular.," *Actas Dermo-Sifiliográficas*, vol. 90, no. 4, pp. 143–155, 1999.
- [16] B. U. Pauli, H. G. Augustin-Voss, M. E. el-Sabban, R. C. Johnson, and D. A. Hammer, "Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 9, no. 3, pp. 175–189, Nov. 1990.
- [17] L. A. Liotta, "Mechanisms of cancer invasion and metastasis," *Important Adv. Oncol.*, pp. 28–41, 1985.
- [18] E. C. Woodhouse, R. F. Chuaqui, and L. A. Liotta, "General mechanisms of metastasis," *Cancer*, vol. 80, no. 8 Suppl, pp. 1529–1537, Oct. 1997.
- [19] D. X. Nguyen, P. D. Bos, and J. Massagué, "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 274–284, Apr. 2009.
- [20] P. Ferrer Pastor, "Efectos anticancerosos de polifenoles naturales: Peterostilbeno y quercetina.," Universitat de València, 2008.
- [21] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, S.A., 2008.
- [22] M. Jakóbsiak, W. Lasek, and J. Gołab, "Natural mechanisms protecting against cancer," *Immunol. Lett.*, vol. 90, no. 2–3, pp. 103–122, Dec. 2003.
- [23] Cerdá Mico, C, Salvador Verdú, A, Ocete Monchón, D, Torregrosa Sánchez, R, Fandos Martínez, M, and Sáez Tormo, G, "Estrés oxidativo, envejecimiento y cáncer.," in *Biogerontología médica*, Ediciones Ergon, 2009, pp. 71–85.
- [24] W. C. Hahn and R. A. Weinberg, "Modelling the molecular circuitry of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 5, pp. 331–341, May 2002.
- [25] H. Chial, "Proto-oncogenes to Oncogenes to Cancer," *Nat. Educ.*, vol. 1, 2008.
- [26] R. A. Weinberg, "Así se produce el cáncer," *Investig. Cienc.*, vol. 242, pp. 10–18, Nov. 1996.
- [27] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. 2002.
- [28] R. K. Thomas, A. C. Baker, R. M. DeBiasi, W. Winckler, T. LaFramboise, W. M. Lin, M. Wang, W. Feng, T. Zander, L. E. MacConaill, J. C. Lee, R. Nicoletti, C. Hatton, M. Goyette, L. Girard, K. Majmudar, L. Ziaugra, K.-K. Wong, S. Gabriel, R. Beroukhim, M. Peyton, J. Barretina, A. Dutt, C. Emery, H. Greulich, K. Shah, H. Sasaki, A. Gazdar, J. Minna, S. A. Armstrong, I. K. Mellinghoff, F. S. Hodi, G. Dranoff, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, S. F. Nelson, L. M. Liau, K. Mertz, M. A. Rubin, H. Moch, M. Loda, W. Catalona, J. Fletcher, S. Signoretti, F. Kaye, K. C. Anderson, G. D. Demetri, R. Dummer, S. Wagner, M. Herlyn, W. R. Sellers, M. Meyerson, and L. A. Garraway, "High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 3, pp. 347–351, Feb. 2007.
- [29] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, D. Baltimore, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, S. L. Zipursky, and J. Darnell, *Biología Celular y Molecular*, 5ª ed. Medica Panamericana, 2005.

- [30] D. R. Spigel, "HER2 and surgery: more questions to answer," *The Lancet*, vol. 362, no. 9383, pp. 502–503, Aug. 2003.
- [31] E. Tagliabue, R. Agresti, M. L. Carcangiu, C. Ghirelli, D. Morelli, M. Campiglio, M. Martel, R. Giovanazzi, M. Greco, A. Balsari, and S. Ménard, "Role of HER2 in wound-induced breast carcinoma proliferation," *The Lancet*, vol. 362, no. 9383, pp. 527–533, Aug. 2003.
- [32] T. A. Yap, C. P. Carden, and S. B. Kaye, "Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 167–181, Mar. 2009.
- [33] J. Downward, "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 11–22, Jan. 2003.
- [34] S. Xanthoudakis, G. Miao, F. Wang, Y. C. Pan, and T. Curran, "Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme.," *EMBO J.*, vol. 11, no. 9, pp. 3323–3335, Sep. 1992.
- [35] A. G. Knudson, "Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 68, no. 4, pp. 820–823, Apr. 1971.
- [36] H. Chial, "Tumor Suppressor (TS) Genes and the Two-Hit Hypothesis," *Nat. Educ.*, vol. 1, 2008.
- [37] R. A. Kleinerman, M. A. Tucker, R. E. Tarone, D. H. Abramson, J. M. Seddon, M. Stovall, F. P. Li, and J. F. Fraumeni, "Risk of New Cancers After Radiotherapy in Long-Term Survivors of Retinoblastoma: An Extended Follow-Up," *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 10, pp. 2272–2279, Apr. 2005.
- [38] A. Muñoz, *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Hélice, 2004.
- [39] A. J. Wein, L. R. K. M.D, A. C. Novick, and A. W. P. M.D, *Campbell-Walsh Urologia*. Ed. Médica Panamericana, 2007.
- [40] B. N. Chau and J. Y. J. Wang, "Coordinated regulation of life and death by RB," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 2, pp. 130–138, Feb. 2003.
- [41] A. Vazquez, E. E. Bond, A. J. Levine, and G. L. Bond, "The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 12, pp. 979–987, Diciembre 2008.
- [42] G. Bond, W. Hu, and A. Levine, "MDM2 is a Central Node in the p53 Pathway: 12 Years and Counting," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 5, no. 1, pp. 3–8, Feb. 2005.
- [43] J. A. Pintor Toro and J. A. Bernal, "Securina. Modulaci3n de las funciones de p53," *Investig. Cienc.*, vol. 324, pp. 33–35, Sep. 2003.
- [44] D. W. Meek, "Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 714–723, Oct. 2009.
- [45] M. Esteller, "Epigenetics in Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 11, pp. 1148–1159, 2008.
- [46] M. D. Delgado Villar, "Modificaciones de la cromatina, regulaci3n g3nica y c3ncer," *Monogr. Real Acad. Nac. Farm.*, vol. XXIV, Apr. 2009.
- [47] F. J. Novo Villaverde, "Modificaciones epigen3ticas en la regulaci3n de la cromatina," 01-Jan-2012. [Online]. Available: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema2-3.html>. [Accessed: 07-Aug-2013].
- [48] "La impronta gen3mica: cl3usulas de nuestro testamento gen3tico," *Medicina molecular FIBAO*, Sep-2010. [Online]. Available: http://medmol.es/revisiones/revision_a10_08_impronta_genomical. [Accessed: 05-Aug-2013].
- [49] S. Biliya and L. A. Bulla Jr, "Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes," *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, vol. 235, no. 2, pp. 139–147, Feb. 2010.

- [50] W. G. Nelson, A. M. De Marzo, and T. L. DeWeese, "The molecular pathogenesis of prostate cancer: Implications for prostate cancer prevention," *Urology*, vol. 57, no. 4 Suppl 1, pp. 39–45, Apr. 2001.
- [51] W. G. Nelson, A. M. De Marzo, and S. Yegnasubramanian, "Epigenetic Alterations in Human Prostate Cancers," *Endocrinology*, vol. 150, no. 9, pp. 3991–4002, Sep. 2009.
- [52] S. V. Harden, Z. Guo, J. I. Epstein, and D. Sidransky, "Quantitative Gstp1 Methylation Clearly Distinguishes Benign Prostatic Tissue And Limited Prostate Adenocarcinoma," *J. Urol.*, vol. 169, no. 3, pp. 1138–1142, Mar. 2003.
- [53] D. V. Makarov, S. Loeb, R. H. Getzenberg, and A. W. Partin, "Biomarkers for Prostate Cancer," *Annu. Rev. Med.*, vol. 60, no. 1, pp. 139–151, Feb. 2009.
- [54] A. P. Wolffe and M. A. Matzke, "Epigenetics: Regulation Through Repression," *Science*, vol. 286, no. 5439, pp. 481–486, Oct. 1999.
- [55] R. Jaenisch and A. Bird, "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals," *Nat. Genet.*, vol. 33, pp. 245–254, Mar. 2003.
- [56] J. Lopez, M. Percharde, H. M. Coley, A. Webb, and T. Crook, "The context and potential of epigenetics in oncology," *Br. J. Cancer*, vol. 100, no. 4, pp. 571–577, 2009.
- [57] J. L. Mauriz, P. Linares, P. González, and J. M. Culebras, "Tratamiento antiangiogénico del cáncer," *Cir. Esp.*, vol. 78, no. 1, pp. 3–11, Jul. 2005.
- [58] C. B. Boticario and M. C. Angosto, *Innovaciones en Cáncer*. Editorial UNED, 2009.
- [59] G. Bergers and L. E. Benjamin, "Tumorigenesis and the angiogenic switch," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 401–410, Jun. 2003.
- [60] J. Folkman, T. Browder, and J. Palmblad, "Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application," *Thromb. Haemost.*, vol. 86, no. 1, pp. 23–33, Jul. 2001.
- [61] Benlloch García, María, "Depleción de GSH y Bcl-2 en células de melanoma maligno B16: mecanismos de sensibilización frente al estrés oxidativo/nitrosativo y la quimioterapia.," Universidad de Valencia, 2008.
- [62] O. López, Y. Magariño, and R. Delgado, "El proceso angiogénico y el cáncer," *Biotechnol. Apl.*, vol. 26, no. 2, pp. 111–116, Jun. 2009.
- [63] C. Clapp, S. Thebault, M. C. Jeziorski, and G. M. D. L. Escalera, "Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis," *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 4, pp. 1177–1215, Oct. 2009.
- [64] P. T. Sánchez, R. Sirera, J. M. Sánchez, and C. Camps, "Comunicación y Psicobioquímica," *Cuad. Monográficos Psicobioquímica*, vol. 1, no. 1, pp. 13–23, Sep. 2012.
- [65] R. Kerbel and J. Folkman, "Clinical translation of angiogenesis inhibitors," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 10, pp. 727–739, Oct. 2002.
- [66] J. L. Yu, J. W. Rak, B. L. Coomber, D. J. Hicklin, and R. S. Kerbel, "Effect of p53 Status on Tumor Response to Antiangiogenic Therapy," *Science*, vol. 295, no. 5559, pp. 1526–1528, Feb. 2002.
- [67] K. Hida, Y. Hida, D. N. Amin, A. F. Flint, D. Panigrahy, C. C. Morton, and M. Klagsbrun, "Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 22, pp. 8249–8255, Nov. 2004.
- [68] R. S. Kerbel, "Tumor Angiogenesis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 19, pp. 2039–2049, 2008.

- [69] J. Welte, S. Loges, S. Dimmeler, and P. Carmeliet, "Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 8, pp. 3190–3200, Aug. 2013.
- [70] S. Loges, T. Schmidt, and P. Carmeliet, "Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates," *Genes Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 12–25, Jan. 2010.
- [71] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 298–307, May 2011.
- [72] A. C. Leal Peralta, "Efecto de la inhibición de PARP-1 sobre angiogénesis, metástasis y mimetismo vasculogénico en melanoma," Universidad de Granada, 2013.
- [73] R. Muñoz-Chápuli, "Vasculogénesis postnatal y macrófagos taladradores: La sorpresas no acaban," 01-Jan-2012. [Online]. Available: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros65/vasculogenesis.htm>. [Accessed: 12-Aug-2013].
- [74] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [75] L. A. Liotta, "Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture.," *Am. J. Pathol.*, vol. 117, no. 3, pp. 339–348, Dec. 1984.
- [76] E. Ruoslahti, "Así se propaga el cáncer," *Investig. Cienc.*, vol. 242, pp. 20–26, Nov. 1996.
- [77] F. van Roy and G. Berx, "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 23, pp. 3756–3788, Dec. 2008.
- [78] B. P. Wijnhoven, W. N. Dinjens, and M. Pignatelli, "E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer," *Br. J. Surg.*, vol. 87, no. 8, pp. 992–1005, Aug. 2000.
- [79] J. S. Desgrosellier and D. A. Cheresh, "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 9–22, Jan. 2010.
- [80] S. Pelengaris and M. Khan, *The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside*. John Wiley & Sons, 2013.
- [81] P. Molist García, M. Á. Pombal Diego, and M. Megías Pacheco, "Matriz extracelular. Glucoproteínas. Adhesión," 22-May-2008. [Online]. Available: http://webs.uvigo.es/mmegias/5-celulas/2-componentes_glucoproteinas.php. [Accessed: 07-Aug-2013].
- [82] W. Birchmeier, "E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene," *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 97–99, Feb. 1995.
- [83] F. J. Rodriguez, L. J. Lewis-Tuffin, and P. Z. Anastasiadis, "E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1826, no. 1, pp. 23–31, Aug. 2012.
- [84] S. M. Frisch and H. Francis, "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis," *J. Cell Biol.*, vol. 124, no. 4, pp. 619–626, Feb. 1994.
- [85] M. A. Schwartz, "Transmembrane signalling by integrins," *Trends Cell Biol.*, vol. 2, no. 10, pp. 304–308, Oct. 1992.
- [86] C. H. Streuli and M. J. Bissell, "Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum," *J. Cell Biol.*, vol. 110, no. 4, pp. 1405–1415, Apr. 1990.
- [87] F. Fang, G. Orend, N. Watanabe, T. Hunter, and E. Ruoslahti, "Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage," *Science*, vol. 271, no. 5248, pp. 499–502, Jan. 1996.

- [88] S. Aznavoorian, A. N. Murphy, W. G. Stetler-Stevenson, and L. A. Liotta, "Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis," *Cancer*, vol. 71, no. 4, pp. 1368–1383, 1993.
- [89] C. W. Wong, A. Lee, L. Shientag, J. Yu, Y. Dong, G. Kao, A. B. Al-Mehdi, E. J. Bernhard, and R. J. Muschel, "Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 1, pp. 333–338, Jan. 2001.
- [90] M. R. Fein and M. Egeblad, "Caught in the act: revealing the metastatic process by live imaging," *Dis. Model. Mech.*, vol. 6, no. 3, pp. 580–593, May 2013.
- [91] K. J. Luzzi, I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, N. Kerkvliet, V. L. Morris, A. F. Chambers, and A. C. Groom, "Multistep Nature of Metastatic Inefficiency," *Am. J. Pathol.*, vol. 153, no. 3, pp. 865–873, Sep. 1998.
- [92] R. R. Langley and I. J. Fidler, "Tumor Cell-Organ Microenvironment Interactions in the Pathogenesis of Cancer Metastasis," *Endocr. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 297–321, May 2007.
- [93] C. Román Curto and M. Armijo Moreno, "El proceso metastásico. II: diseminación tumoral directa, linfática y hemática (1ª parte).," *Actas Dermo-Sifiliográficas*, vol. 90, no. 6, pp. 277–290, 1999.
- [94] L. Weiss, "Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 227–235, Nov. 1992.
- [95] L. A. Liotta, J. Kleinerman, and G. M. Saldel, "The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process," *Cancer Res.*, vol. 36, no. 3, pp. 889–894, Mar. 1976.
- [96] M. Bockhorn, R. K. Jain, and L. L. Munn, "Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?," *Lancet Oncol.*, vol. 8, no. 5, pp. 444–448, May 2007.
- [97] J. A. Joyce and J. W. Pollard, "Microenvironmental regulation of metastasis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 239–252, Apr. 2009.
- [98] C. Monteagudo, A. Pellín-Carcelén, J. M. Martín, and D. Ramos, "Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma," *Actas Dermo-Sifiliográficas*, vol. 102, no. 7, pp. 498–504, Sep. 2011.
- [99] C. Román Curto and M. Armijo Moreno, "El proceso metastásico. III: extravasación y proliferación en el órgano diana," *Actas Dermo-Sifiliográficas*, vol. 90, no. 7, pp. 343–357, 1999.
- [100] J. A. Aguirre-Ghiso, "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 11, pp. 834–846, Nov. 2007.
- [101] M. L. Gutiérrez Menéndez, L. Quintana, C. Domínguez, E. Bordón, and P. Lara, "Enfermedad Mínima Residual," *Biocáncer*, vol. 4, 2007.
- [102] N. Almog, "Molecular mechanisms underlying tumor dormancy," *Cancer Lett.*, vol. 294, no. 2, pp. 139–146, Aug. 2010.
- [103] E. Comen, L. Norton, and J. Massagué, "Clinical implications of cancer self-seeding," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 6, pp. 369–377, Jun. 2011.
- [104] J. Massagué, "Evolución y metástasis del cáncer," *SEBBM*, vol. 160, Jun. 2009.
- [105] M. Schultz, "Rudolf Virchow. Photo quiz," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 9, pp. 1480–1481, Sep. 2008.
- [106] Z. Aragón, C. X. Bonkanka, J. A. Gallardo, D. García, and M. C. Medina, "Luces y Sombras en el Uso de Quinasas Dependientes de Ciclinas como Dianas Terapéuticas en Cáncer," *Biocáncer*, vol. 3, 2006.

- [107] J. Massagué, "G1 cell-cycle control and cancer," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 298–306, Nov. 2004.
- [108] H. Okada and T. W. Mak, "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 8, pp. 592–603, Aug. 2004.
- [109] L. Hayflick and P. S. Moorhead, "The serial cultivation of human diploid cell strains," *Exp. Cell Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 585–621, Dec. 1961.
- [110] D. Stipp, "Senescencia celular," *Investig. Cienc.*, vol. 433, pp. 78–83, Oct. 2012.
- [111] J. Miquel, "Teorías del envejecimiento: selección e integración," in *Biogerontología médica*, Ediciones Ergon, 2009, pp. 1–12.
- [112] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence," *J. Cell Biol.*, vol. 192, no. 4, pp. 547–556, Feb. 2011.
- [113] J. Krishnamurthy, C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su, and N. E. Sharpless, "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging," *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 9, pp. 1299–1307, Nov. 2004.
- [114] V. Janzen, R. Forkert, H. E. Fleming, Y. Saito, M. T. Waring, D. M. Dombkowski, T. Cheng, R. A. DePinho, N. E. Sharpless, and D. T. Scadden, "Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a," *Nature*, vol. 443, no. 7110, pp. 421–426, Sep. 2006.
- [115] Y. Liu, H. K. Sanoff, H. Cho, C. E. Burd, C. Torrice, J. G. Ibrahim, N. E. Thomas, and N. E. Sharpless, "Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging," *Aging Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 439–448, Aug. 2009.
- [116] A. Krtolica, S. Parrinello, S. Lockett, P.-Y. Desprez, and J. Campisi, "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 21, pp. 12072–12077, Oct. 2001.
- [117] F. H. Igney and P. H. Krammer, "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 4, pp. 277–288, Apr. 2002.
- [118] M. O. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–776, 2000.
- [119] C. Borner, "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions," *Mol. Immunol.*, vol. 39, no. 11, pp. 615–647, Jan. 2003.
- [120] V. Deretic and D. J. Klionsky, "Autofagia," *Investig. Cienc.*, vol. 382, pp. 54–61, Jul. 2008.
- [121] T. Vellai, "Autophagy genes and ageing," *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 1, pp. 94–102, Sep. 2008.
- [122] M. A. Lizarbe Iracheta, "El suicidio y la muerte celular," *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*, vol. 101, no. 2, 2007.
- [123] R. C. Duke, D. M. Ojcius, and J. Ding-E Young, "Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad," *Investig. Cienc.*, vol. 245, pp. 44–52, Feb. 1997.
- [124] D. A. Kubli and Å. B. Gustafsson, "Mitochondria and Mitophagy The Yin and Yang of Cell Death Control," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 9, pp. 1208–1221, Oct. 2012.
- [125] Y. Tsujimoto, J. Cossman, E. Jaffe, and C. M. Croce, "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma," *Science*, vol. 228, no. 4706, pp. 1440–1443, Jun. 1985.
- [126] K. H. Cheeseman and T. F. Slater, "An introduction to free radical biochemistry," *Br. Med. Bull.*, vol. 49, no. 3, pp. 481–493, Jul. 1993.

- [127] A. Salvador, S. Donderis, C. Olivares, M. Guaita, O. Espinosa, J. Rodríguez, M. Fandos, and G.T. Sáez, "El estrés oxidativo en la patología degenerativa. Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular," *Rev. Quím. Clínica*, vol. 25, no. 2, pp. 49–57, 2006.
- [128] R. Olinescu and D. T. L. Smith, *Free Radicals in Medicine*. Nova Publishers, 2002.
- [129] M. Vallet, J. Faus, E. García-España, and J. Moratal, *Introducción a la Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis, S.A., 2003.
- [130] W. Reusch, "Oxygen Molecular Orbital Diagram," 05-May-2013. [Online]. Available: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/illust2.htm>. [Accessed: 28-Aug-2013].
- [131] F. Córdoba, "Estrés oxidativo," 21-Apr-2004. [Online]. Available: <http://www.uhu.es/francisco.cordoba/asignaturas/postgrado/estres/doc/estres.pdf>. [Accessed: 29-Aug-2013].
- [132] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, 2007.
- [133] J. Rodrigo, E. Moreno Gómez, and R. Martínez Murillo, "Fisiología y fisiopatología del óxido nítrico," *Mente Cereb.*, no. 18, pp. 83–88, Jun. 2006.
- [134] J. F. Curtin, M. Donovan, and T. G. Cotter, "Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis," *J. Immunol. Methods*, vol. 265, no. 1–2, pp. 49–72, Jul. 2002.
- [135] E. Cadenas, A. Boveris, C. I. Ragan, and A. O. Stoppani, "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 180, no. 2, pp. 248–257, Apr. 1977.
- [136] V. Valls Bellés, P. Codoñer Franch, M. Luisa González San-José, and Pilar Muñoz Rodríguez, "Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza: efecto antioxidante 'in vivo,'" *Cerveza Malta*, 2005.
- [137] S. Touriño, "Contribución a las bases científicas para el uso de fibra dietética antioxidante y fracciones polifenólicas en la prevención de cáncer. Composición, actividad, metabolitos y biodisponibilidad," Universidad de Barcelona, 2010.
- [138] W. M. Nauseef, "Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*
- [139] J. Himmelfarb, P. Stenvinkel, T. A. Ikizler, and R. M. Hakim, "The elephant in uremia: Oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia," *Kidney Int.*, vol. 62, no. 5, pp. 1524–1538, Nov. 2002.
- [140] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, 1989.
- [141] H. Kamata and H. Hirata, "Redox Regulation of Cellular Signalling," *Cell. Signal.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Jan. 1999.
- [142] T. Mann and D. Keilin, "Haemocuprein and Hepatocuprein, Copper-Protein Compounds of Blood and Liver in Mammals," *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.*, vol. 126, no. 844, pp. 303–315, Dec. 1938.
- [143] J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, Nov. 1969.
- [144] C. K. Mathews, K. G. Ahern, and K. E. V. Holde, *Bioquímica*, 3a ed. Pearson Educación, 2002.

- [145] D. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. Oregan, H. Deng, Z. Rahmani, A. Krizus, D. Mckennayasek, A. Cayabyab, S. Gaston, R. Berger, R. Tanzi, J. Halperin, B. Herzfeldt, R. Vandenberg, W. Hung, T. Bird, G. Deng, D. Mulder, C. Smyth, N. Laing, E. Soriano, M. Pericakvance, J. Haines, G. Rouleau, J. Gusella, H. Horvitz, and R. Brown, "Mutations in Cu/Zn Superoxide-Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis," *Nature*, vol. 362, no. 6415, pp. 59–62, Mar. 1993.
- [146] P. D. Mascio, M. E. Murphy, and H. Sies, "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols.," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 53, no. 1, p. 194S–200S, Jan. 1991.
- [147] F. Tomás Barberán, "Los polifenoles de los alimentos y la salud," *Aliment. Nutr. Salud*, vol. 10, no. 2, pp. 41–53, 2003.
- [148] M. Foronda, L. E. Donate, and M. A. Blasco, "Importancia de los telómeros y la telomerasa en cáncer, envejecimiento y medicina regenerativa," *Acta Científica Tecnológica*, vol. 20, pp. 39–47, 2012.
- [149] T. de Lange, "T-loops and the origin of telomeres," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 323–329, Abril 2004.
- [150] A. Grach, "Telomere Shortening Mechanisms," in *The Mechanisms of DNA Replication*, InTech, 2013.
- [151] Carol W. Greider and Elizabeth H. Blackburn, "Telómeros, telomerasa y cáncer," *Investig. Cienc.*, vol. 235, pp. 20–26, Abril 1996.
- [152] C. O'Connor, "Telomeres of Human Chromosomes," *Nat. Educ.*, vol. 1, 2008.
- [153] P. Hayes and B. Meints, "The telomerase solution," 19-Oct-2011. [Online]. Available: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema2-3.html>. [Accessed: 01-Sep-2013].
- [154] W. N. Keith, A. Bilsland, M. Hardie, and T. J. Evans, "Drug Insight: cancer cell immortality—telomerase as a target for novel cancer gene therapies," *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 1, no. 2, pp. 88–96, 2004.
- [155] R. Ripoll Martín, "Cuantificación en tiempo real de la subunidad hTERT (Telomerase Reverse Transcriptase) del gen de la telomerasa en plasma de pacientes con cáncer colorrectal.," info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, 2007.
- [156] S. Petersen, G. Saretzki, and T. von Zglinicki, "Preferential Accumulation of Single-Stranded Regions in Telomeres of Human Fibroblasts," *Exp. Cell Res.*, vol. 239, no. 1, pp. 152–160, Feb. 1998.
- [157] T. von Zglinicki, G. Saretzki, J. Ladhoff, F. d'Adda di Fagagna, and S. P. Jackson, "Human cell senescence as a DNA damage response," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 126, no. 1, pp. 111–117, Jan. 2005.
- [158] S. Kawanishi and S. Oikawa, "Mechanism of telomere shortening by oxidative stress," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1019, pp. 278–284, Jun. 2004.
- [159] J. Albanell Mestres, "Telomerasa: regulación, diana terapéutica y significado clínico en neoplasias humanas," info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, Universitat Autònoma de Barcelona, 2001.
- [160] A. H. Ligon, "Telomeres," *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, vol. 8, no. 2, pp. 194–198, 2004.
- [161] D. Del Bufalo, A. Rizzo, D. Trisciuglio, G. Cardinali, M. R. Torrisi, U. Zangemeister-Wittke, G. Zupi, and A. Biroccio, "Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 11, pp. 1429–1438, Nov. 2005.

- [162] M. Ruden and N. Puri, "Novel anticancer therapeutics targeting telomerase," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, no. 5, pp. 444–456, Agosto 2013.
- [163] Á. L. Ortega, S. Mena, and J. M. Estrela, "Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment," *Cancers*, vol. 2, no. 2, pp. 274–304, Mar. 2010.
- [164] R. G. Allen and M. Tresini, "Oxidative stress and gene regulation," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, no. 3, pp. 463–499, Feb. 2000.
- [165] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D. A. Butterfield, and A. M. Giuffrida Stella, "Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 10, pp. 766–775, Oct. 2007.
- [166] D. Fukumura, S. Kashiwagi, and R. K. Jain, "The role of nitric oxide in tumour progression," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 7, pp. 521–534, Jul. 2006.
- [167] L. J. Hofseth, S. P. Hussain, G. N. Wogan, and C. C. Harris, "Nitric oxide in cancer and chemoprevention," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 34, no. 8, pp. 955–968, Apr. 2003.
- [168] A. Minelli, I. Bellezza, C. Conte, and Z. Culig, "Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer?," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1795, no. 2, pp. 83–91, Abril 2009.
- [169] D. Harman, "Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry," *J. Gerontol.*, vol. 11, no. 3, pp. 298–300, Jul. 1956.
- [170] D. D. Mruk, B. Silvestrini, M. Mo, and C. Y. Cheng, "Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility," *Contraception*, vol. 65, no. 4, pp. 305–311, Apr. 2002.
- [171] G. E. Gonzalez, "Efecto de los isoprostanos en la reactividad vascular pulmonar y sistémica durante el período neonatal," Barcelona, 2005.
- [172] B. Frei, "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action," *Am. J. Med.*, vol. 97, no. 3A, p. 5S–13S; discussion 22S–28S, Sep. 1994.
- [173] S. H. Wong, J. A. Knight, S. M. Hopfer, O. Zaharia, C. N. Leach, and F. W. Sunderman, "Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct," *Clin. Chem.*, vol. 33, no. 2, pp. 214–220, Feb. 1987.
- [174] J. D. Morrow, T. M. Harris, and L. J. Roberts 2nd, "Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids," *Anal. Biochem.*, vol. 184, no. 1, pp. 1–10, Jan. 1990.
- [175] J. D. Morrow and L. J. Roberts, "The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation," *Prog. Lipid Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–21, Mar. 1997.
- [176] A. E. Díaz-Acosta and J. Membrillo-Hernández, "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos," *Tip Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas*, vol. 9, no. 1, pp. 34–44, 2006.
- [177] F. Vargas, C. Rivas, A. Nursamaa, and T. Zoltan, "Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento," *Av. En Quím.*, vol. 2, no. 2, pp. 3–15, 2007.
- [178] K. J. Davies, "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 20, pp. 9895–9901, Jul. 1987.
- [179] E. R. Stadtman, H. Van Remmen, A. Richardson, N. B. Wehr, and R. L. Levine, "Methionine oxidation and aging," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1703, no. 2, pp. 135–140, Jan. 2005.

- [180] O. M. Saavedra, E. N. J. Vázquez, M. R. B. G. Vargas, G. M. C. Reyes, and E. M. Bolaina, "Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas," *Rev. Médica Univ. Veracruzana*, vol. 10, no. 2, pp. 32–39, Jul. 2010.
- [181] J. R. Requena, C.-C. Chao, R. L. Levine, and E. R. Stadtman, "Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 1, pp. 69–74, Jan. 2001.
- [182] M. R. Oliva, P. Muñoz, V. Vallas, A. Iradi, E. Drehmer, M.D. Catalá, C. Cañete Nicolás, G. T. Sáez, "Radicales libres y modificación oxidativa del DNA. Implicaciones en la carcinogénesis experimental y humana," in *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*, Real Academia de Farmacia, 1997.
- [183] S. S. David, V. L. O'Shea, and S. Kundu, "Base-excision repair of oxidative DNA damage," *Nature*, vol. 447, no. 7147, pp. 941–950, Jun. 2007.
- [184] S. Borrego, A. Vazquez, F. Dasí, C. Cerdá, A. Iradi, C. Tormos, J. M. Sánchez, L. Bagán, J. Boix, C. Zaragoza, J. Camps, and G. Sáez, "Oxidative Stress and DNA Damage in Human Gastric Carcinoma: 8-Oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a Possible Tumor Marker," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 3467–3486, 2013.
- [185] M. R. Oliva, F. Ripoll, P. Muñoz, A. Iradi, R. Trullenque, V. Valls, E. Drehmer, and G. T. Sáez, "Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community," *Mol. Carcinog.*, vol. 18, no. 4, pp. 232–243, Apr. 1997.
- [186] J. C. Espín de Gea and F. Tomás-Barberán, "Polifenoles y salud. Propiedades biológicas de polifenoles de la uva y la granada," *Investig. Cienc.*, vol. 356, pp. 34–36, May 2006.
- [187] E. Haslam, *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. CUP Archive, 1989.
- [188] L. Bravo, "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance," *Nutr. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 317–333, 1998.
- [189] E. Haslam, "Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action," *J. Nat. Prod.*, vol. 59, no. 2, pp. 205–215, Jan. 1996.
- [190] A. Scalbert, I. T. Johnson, and M. Saltmarsh, "Polyphenols: antioxidants and beyond," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1, p. 215S–217S, Jan. 2005.
- [191] C. K. Sen, S. Khanna, G. Gordillo, D. Bagchi, M. Bagchi, and S. Roy, "Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 957, pp. 239–249, May 2002.
- [192] H. Akiyama, K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, and K. Iwatsuki, "Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, no. 4, pp. 487–491, Oct. 2001.
- [193] K. P. Latté and H. Kolodziej, "Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts," *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.*, vol. 55, no. 5–6, pp. 467–472, Jun. 2000.
- [194] J. A. O. Ojewole, "Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice," *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, vol. 28, no. 7, pp. 441–446, Sep. 2006.
- [195] C. C. Sánchez-Mateo, C. X. Bonkanka, M. Hernández-Pérez, and R. M. Rabanal, "Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 107, no. 1, pp. 1–6, Aug. 2006.
- [196] I. Rahman, S. K. Biswas, and P. A. Kirkham, "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 11, pp. 1439–1452, Nov. 2006.

- [197] B. Zhao, "Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease," *Neurochem. Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 630–638, Apr. 2009.
- [198] J. Joseph, G. Cole, E. Head, and D. Ingram, "Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration," *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 41, pp. 12795–12801, Oct. 2009.
- [199] M. Michalska, A. Gluba, D. P. Mikhailidis, P. Nowak, A. Bielecka-Dabrowa, J. Rysz, and M. Banach, "The role of polyphenols in cardiovascular disease," *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 16, no. 5, pp. RA110–119, May 2010.
- [200] E. P. Cherniack, "Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome," *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.*, vol. 27, no. 6, pp. 617–623, Jun. 2011.
- [201] M. T. Mitjavila, M. Fandos, J. Salas-Salvadó, M.-I. Covas, S. Borrego, R. Estruch, R. Lamuela-Raventós, D. Corella, M. Á. Martínez-Gonzalez, J. M. Sánchez, M. Bulló, M. Fitó, C. Tormos, C. Cerdá, R. Casillas, J. J. Moreno, A. Iradi, C. Zaragoza, J. Chaves, and G. T. Sáez, "The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial," *Clin. Nutr.*, Aug. 2012.
- [202] J. C. Milne, P. D. Lambert, S. Schenk, D. P. Carney, J. J. Smith, D. J. Gagne, L. Jin, O. Boss, R. B. Perni, C. B. Vu, J. E. Bemis, R. Xie, J. S. Disch, P. Y. Ng, J. J. Nunes, A. V. Lynch, H. Yang, H. Galonek, K. Israelian, W. Choy, A. Iffland, S. Lavu, O. Medvedik, D. A. Sinclair, J. M. Olefsky, M. R. Jirousek, P. J. Elliott, and C. H. Westphal, "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes," *Nature*, vol. 450, no. 7170, pp. 712–716, Nov. 2007.
- [203] M. Asensi, A. Ortega, S. Mena, F. Feddi, and J. M. Estrela, "Natural polyphenols in cancer therapy," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 48, no. 5–6, pp. 197–216, Dec. 2011.
- [204] J. A. Marco Ventura, *Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario*. Síntesis, 2006.
- [205] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouységu, "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 3, pp. 586–621, 2011.
- [206] K. Xiao, H.-J. Zhang, L.-J. Xuan, J. Zhang, Y.-M. Xu, and D.-L. Bai, "Stilbenoids: Chemistry and bioactivities," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. Volume 34, Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier, 2008, pp. 453–646.
- [207] B. B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R. S. Aggarwal, N. P. Seeram, S. Shishodia, and Y. Takada, "Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies," *Anticancer Res.*, vol. 24, no. 5A, pp. 2783–2840, Sep. 2004.
- [208] I. Alfaras Cardenal, "Estudi de la biodisponibilitat del trans-resveratrol i el seu efecte quimiopreventiu del càncer de còlon induït per 1,2-dimetilhidrazina en rata," Universitat de Barcelona, 2011.
- [209] Food and Drug Administration, "Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations." Mar-2003.
- [210] S. Possemiers, S. Bolca, W. Verstraete, and A. Heyerick, "The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 1, pp. 53–66, Jan. 2011.
- [211] E. Cid Cárcamo, "Introducción a la farmacocinética," 1982. [Online]. Available: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmacologicas/cide02/. [Accessed: 11-Sep-2013].

- [212] J. van Duynhoven, E. E. Vaughan, D. M. Jacobs, R. A. Kemperman, E. J. J. van Velzen, G. Gross, L. C. Roger, S. Possemiers, A. K. Smilde, J. Dore, J. A. Westerhuis, and T. Van de Wiele, "Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. Supplement_1, pp. 4531–4538, Jun. 2010.
- [213] M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto, "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes," *Science*, vol. 275, no. 5297, pp. 218–220, Jan. 1997.
- [214] A. Kotronoulas, N. Pizarro, A. Serra, P. Robledo, J. Joglar, L. Rubió, A. Hernaéz, C. Tormos, M. J. Motilva, M. Fitó, M.-I. Covas, R. Solà, M. Farré, G. Saez, and R. de la Torre, "Dose-dependent metabolic disposition of hydroxytyrosol and formation of mercapturates in rats," *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.*, vol. 77, pp. 47–56, Nov. 2013.
- [215] D. Liska, M. Lyon, and D. S. Jones, "Detoxification and Biotransformational Imbalances," *EXPLORE J. Sci. Heal.*, vol. 2, no. 2, pp. 122–140, Mar. 2006.
- [216] P. Ferrer, M. Asensi, R. Segarra, A. Ortega, M. Benlloch, E. Obrador, M. T. Varea, G. Asensio, L. Jorda, and J. M. Estrela, "Association between Pterostilbene and Quercetin Inhibits Metastatic Activity of B16 Melanoma," *Neoplasia N. Y. N.*, vol. 7, no. 1, pp. 37–47, Jan. 2005.
- [217] M. Asensi, I. Medina, A. Ortega, J. Carretero, M. C. Baño, E. Obrador, and J. M. Estrela, "Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 33, no. 3, pp. 387–398, Aug. 2002.
- [218] L. A. Stivala, M. Savio, F. Carafoli, P. Perucca, L. Bianchi, G. Maga, L. Forti, U. M. Pagnoni, A. Albini, E. Prosperi, and V. Vannini, "Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 22586–22594, Jun. 2001.
- [219] A. M. Rimando, M. Cuendet, C. Desmarchelier, R. G. Mehta, J. M. Pezzuto, and S. O. Duke, "Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene, a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 12, pp. 3453–3457, Jun. 2002.
- [220] C. M. Remsberg, J. A. Yáñez, Y. Ohgami, K. R. Vega-Villa, A. M. Rimando, and N. M. Davies, "Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity," *Phytother. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 169–179, 2008.
- [221] S. Mena, M. L. Rodríguez, X. Ponsoda, J. M. Estrela, M. Jäätela, and A. L. Ortega, "Pterostilbene-Induced Tumor Cytotoxicity: A Lysosomal Membrane Permeabilization-Dependent Mechanism," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 9, p. e44524, Sep. 2012.
- [222] R. Mikstacka, D. Przybylska, A. M. Rimando, and W. Baer-Dubowska, "Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 5, pp. 517–524, May 2007.
- [223] H. Zhang, M. Zhang, L. Yu, Y. Zhao, N. He, and X. Yang, "Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8'-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1589–1599, May 2012.
- [224] K. Senthilkumar, R. Arunkumar, P. Elumalai, G. Sharmila, D. N. Gunadharini, S. Banudevi, G. Krishnamoorthy, C. S. Benson, and J. Arunakaran, "Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC-3)," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 29, no. 2, pp. 87–95, Mar. 2011.

- [225] W. Bors, W. Heller, C. Michel, and M. Saran, "[36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies," in *Methods in Enzymology*, vol. Volume 186, A. N. G. Lester Packer, Ed. Academic Press, 1990, pp. 343–355.
- [226] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 933–956, 1996.
- [227] D. A. Dickinson and H. J. Forman, "Glutathione in Defense and Signaling," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 973, no. 1, pp. 488–504, 2002.
- [228] H. Sies, "Glutathione and its role in cellular functions," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 27, no. 9–10, pp. 916–921, Nov. 1999.
- [229] G. K. Balendiran, R. Dabur, and D. Fraser, "The role of glutathione in cancer," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 22, no. 6, pp. 343–352, 2004.
- [230] R. Franco and J. A. Cidlowski, "Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant," *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 10, pp. 1303–1314, online 2009.
- [231] G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, "Glutathione Metabolism and Its Implications for Health," *J. Nutr.*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492, Mar. 2004.
- [232] A. Meister and M. E. Anderson, "Glutathione," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 52, no. 1, pp. 711–760, 1983.
- [233] A. Meister, "Selective modification of glutathione metabolism," *Science*, vol. 220, no. 4596, pp. 472–477, Apr. 1983.
- [234] D. Díaz, C. M. Krejsa, and T. J. Kavanagh, "Expression of glutamate-cysteine ligase during mouse development," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 62, no. 1, pp. 83–91, 2002.
- [235] N. Tateishi, T. Higashi, A. Naruse, K. Nakashima, and H. Shiozaki, "Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine," *J. Nutr.*, vol. 107, no. 1, pp. 51–60, Jan. 1977.
- [236] P. G. Richman and A. Meister, "Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione," *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 4, pp. 1422–1426, Feb. 1975.
- [237] A. Meister, "Glutathione metabolism and its selective modification.," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 33, pp. 17205–17208, Nov. 1988.
- [238] D. M. Bukowski, S. M. Deneke, R. A. Lawrence, and S. G. Jenkinson, "A noninducible cystine transport system in rat alveolar type II cells," *Am. J. Physiol.*, vol. 268, no. 1 Pt 1, pp. L21–26, Jan. 1995.
- [239] R. G. Knickelbein, T. Seres, G. Lam, R. B. Johnston Jr, and J. B. Warshaw, "Characterization of multiple cysteine and cystine transporters in rat alveolar type II cells," *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 6 Pt 1, pp. L1147–1155, Dec. 1997.
- [240] S. M. Deneke and B. L. Fanburg, "Regulation of cellular glutathione," *Am. J. Physiol.*, vol. 257, no. 4 Pt 1, pp. L163–173, Oct. 1989.
- [241] J. M. Estrela, A. Ortega, and E. Obrador, "Glutathione in cancer biology and therapy," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 43, no. 2, pp. 143–181, 2006.
- [242] L. Thelander and P. Reichard, "Reduction of Ribonucleotides," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 48, no. 1, pp. 133–158, 1979.
- [243] J. Markovic, N. Mora, A. Gimeno, C. Burguete, J. Luis, and F. V., "The Nuclear Compartmentation of Glutathione: Effect on Cell Cycle Progression," in *Selected Topics in DNA Repair*, C. Chen, Ed. InTech, 2011.

- [244] H. Sies, "Biochemistry of Oxidative Stress," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 25, no. 12, pp. 1058–1071, 1986.
- [245] C. A. Martín Plágaro, "Generación de mediadores lipídicos inducida por tert-butilhidroperóxido en hepatocitos de rata / César A. Martín Plágaro," Universidad del País Vasco, 2001.
- [246] M. Alía, S. Ramos, R. Mateos, L. Bravo, and L. Goya, "Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2)," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 19, no. 2, pp. 119–128, 2005.
- [247] M. B. Castro Feo, "Influencia del metabolismo del glutati6n y de la actividad gamma-glutamyltranspeptidasa en la respuesta antitumoral del 6cido retinoico en l6neas tumorales de r6bdomiosarcoma con diferente grado de diferenciaci6n," Universidad del Pa6s Vasco, Servicio Editorial = Euskal Herriko Unibersitatea, Argitalpen Zerbitzua, 2006.
- [248] O. W. Griffith and A. Meister, "Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine).," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 16, pp. 7558–7560, Aug. 1979.
- [249] H. H. Bailey, G. Ripple, K. D. Tutsch, R. Z. Arzoomanian, D. Alberti, C. Feierabend, D. Mahvi, J. Schink, M. Pomplun, R. T. Mulcahy, and G. Wilding, "Phase I Study of Continuous-Infusion I-S,R-Buthionine Sulfoximine With Intravenous Melphalan," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 89, no. 23, pp. 1789–1796, Dec. 1997.
- [250] A. L. Ortega, S. Mena, and J. M. Estrela, "Glutathione in Cancer Cell Death," *Cancers*, vol. 3, no. 4, pp. 1285–1310, Mar. 2011.
- [251] A. Morales, M. Miranda, A. S6nchez-Reyes, A. Biete, and J. C. Fern6ndez-Checa, "Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells," *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 42, no. 1, pp. 191–203, Aug. 1998.
- [252] R. Collado, I. Oliver, C. Tormos, M. Egea, A. Miguel, C. Cerd6, D. Ivars, S. Borrego, F. Carbonell, and G. T. S6ez, "Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis," *Cancer Lett.*, vol. 317, no. 2, pp. 144–149, Apr. 2012.
- [253] M. Sanchez, J. V. Torres, C. Tormos, A. Iradi, P. Mu6niz, O. Espinosa, A. Salvador, J. Rodriguez-Delgado, M. Fandos, and G. T. S6ez, "Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community," *Cancer Lett.*, vol. 233, no. 1, pp. 28–35, Feb. 2006.
- [254] A. M. Oltra, F. Carbonell, C. Tormos, A. Iradi, and G. T. S6ez, "Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 30, no. 11, pp. 1286–1292, Jun. 2001.
- [255] J. Carretero, E. Obrador, M. J. Anasagasti, J. J. Martin, F. Vidal-Vanaclocha, and J. M. Estrela, "Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 17, no. 7, pp. 567–574, 1999.
- [256] G. J. Todaro and H. Green, "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines," *J. Cell Biol.*, vol. 17, pp. 299–313, May 1963.
- [257] S. Aaronson and G. Todaro, "Development of 3t3-like lines from balb/c mouse embryo cultures, transformation susceptibility to sv40.," *Subj. Strain Bibliogr. 1968*, pp. 141–148, Jan. 1968.
- [258] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks, "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1417–1423, Nov. 1973.

- [259] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan, "A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1409–1416, Nov. 1973.
- [260] J. Fogh, *Human tumor cells in vitro*. Plenum Press, 1975.
- [261] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sexta. John Wiley & Sons, 2010.
- [262] P. de Paz Lugo, "Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares: posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta," info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, Universidad de Granada, 2006.
- [263] S. Mena Mollá, "Sensibilización del melanoma maligno a la oncoterapia: depleción del Glutación y BCL-2," Universitat de València, Departament de Fisiologia, Valencia, 2010.
- [264] P. Muñoz, V. Valls, C. Perez-Broseta, A. Iradi, J. V. Climent, M. R. Oliva, and G. T. Sáez, "The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 18, no. 4, pp. 747–755, Apr. 1995.
- [265] H. Wei and K. Frenkel, "Suppression of Tumor Promoter-induced Oxidative Events and DNA Damage in Vivo by Sarcophytol A: A Possible Mechanism of Antipromotion," *Cancer Res.*, vol. 52, no. 8, pp. 2298–2303, Apr. 1992.
- [266] M. A. K. Markwell, S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert, "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples," *Anal. Biochem.*, vol. 87, no. 1, pp. 206–210, Jun. 1978.
- [267] K. Frenkel, Z. J. Zhong, H. C. Wei, J. Karkoszka, U. Patel, K. Rashid, M. Georgescu, and J. J. Solomon, "Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo," *Anal. Biochem.*, vol. 196, no. 1, pp. 126–136, Jul. 1991.
- [268] M. Asensi, J. Sastre, F. V. Pallardo, J. G. Delaasuncion, J. M. Estrela, and J. Vina, "A High-Performance Liquid Chromatography Method for Measurement of Oxidized Glutathione in Biological Samples," *Anal. Biochem.*, vol. 217, no. 2, pp. 323–328, Mar. 1994.
- [269] J. Navarro, E. Obrador, J. A. Pellicer, M. Aseni, J. Viña, and J. M. Estrela, "Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 22, no. 7, pp. 1203–1209, 1997.
- [270] R. Brigelius, C. Muckel, T. P. Akerboom, and H. Sies, "Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 32, no. 17, pp. 2529–2534, Sep. 1983.
- [271] T. P. Akerboom and H. Sies, "Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples," *Methods Enzymol.*, vol. 77, pp. 373–382, 1981.
- [272] M. C. Lasso de la Vega, P. Terradez, E. Obrador, J. Navarro, J. A. Pellicer, and J. M. Estrela, "Inhibition of cancer growth and selective glutathione depletion in Ehrlich tumour cells in vivo by extracellular ATP," *Biochem. J.*, vol. 298 (Pt 1), pp. 99–105, Feb. 1994.
- [273] S. L. Valles, M. Benlloch, M. L. Rodriguez, S. Mena, J. A. Pellicer, M. Asensi, E. Obrador, and J. M. Estrela, "Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism," *J. Transl. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2013.
- [274] M. R. Oliva, A. Iradi, F. Garrido, M. Ramos, A. M. Oltra, P. Muñoz, and G. T. Sáez, "Oxidative stress induces the expression of the major histocompatibility complex in murine tumor cells," *Free Radic. Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 119–128, Aug. 2001.

- [275] C. Tormos, F. Javier Chaves, M. J. Garcia, F. Garrido, R. Jover, J. E. O'Connor, A. Iradi, A. Oltra, M. R. Oliva, and G. T. Sáez, "Role of glutathione in the induction of apoptosis and c-fos and c-jun mRNAs by oxidative stress in tumor cells," *Cancer Lett.*, vol. 208, no. 1, pp. 103–113, May 2004.
- [276] J. Karlsson, M. Emgard, P. Brundin, and M. J. Burkitt, "trans-Resveratrol Protects Embryonic Mesencephalic Cells from tert-Butyl Hydroperoxide," *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 141–150, 2000.
- [277] J. D. Acharya and S. S. Ghaskadbi, "Protective effect of Pterostilbene against free radical mediated oxidative damage," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 13, no. 1, p. 238, Sep. 2013.
- [278] M. L. Kuo, T. C. Meng, and J. K. Lin, "Involvement of glutathione in induction of c-jun proto-oncogene by methylmethanesulfonate in NIH 3T3 cells," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 4, pp. 815–820, Apr. 1996.
- [279] T. S. Huang, S. C. Lee, and J. K. Lin, "Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 12, pp. 5292–5296, Jun. 1991.
- [280] G. Y. Yang, J. Liao, C. Li, J. Chung, E. J. Yurkow, C. T. Ho, and C. S. Yang, "Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 11, pp. 2035–2039, Nov. 2000.
- [281] G. A. Orner, W.-M. Dashwood, and R. H. Dashwood, "Tumor-Suppressing Effects of Antioxidants from Tea," *J. Nutr.*, vol. 134, no. 11, p. 3177S–3178S, Nov. 2004.
- [282] J. D. Hsu, F. P. Chou, M. J. Lee, H. C. Chiang, Y. L. Lin, S. J. Shiow, and C. J. Wang, "Suppression of the TPA-induced expression of nuclear-protooncogenes in mouse epidermis by crocetin via antioxidant activity," *Anticancer Res.*, vol. 19, no. 5B, pp. 4221–4227, Oct. 1999.
- [283] R. M. Niles, M. McFarland, M. B. Weimer, A. Redkar, Y.-M. Fu, and G. G. Meadows, "Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells," *Cancer Lett.*, vol. 190, no. 2, pp. 157–163, Feb. 2003.
- [284] S. Priego, F. Feddi, P. Ferrer, S. Mena, M. Benlloch, A. Ortega, J. Carretero, E. Obrador, M. Asensi, and J. M. Estrela, "Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 10, pp. 3330–3342, Oct. 2008.
- [285] M. P. Fuggetta, G. Lanzilli, M. Tricarico, A. Cottarelli, R. Falchetti, G. Ravagnan, and E. Bonmassar, "Effect of resveratrol on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells in vitro," *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 25, no. 2, pp. 189–193, Jun. 2006.
- [286] H.-H. Cao, A. K.-W. Tse, H.-Y. Kwan, H. Yu, C.-Y. Cheng, T. Su, W.-F. Fong, and Z.-L. Yu, "Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling," *Biochem. Pharmacol.*, Nov. 2013.
- [287] J. Zhang, J. Chiu, H. Zhang, T. Qi, Q. Tang, K. Ma, H. Lu, and G. Li, "Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca²⁺/AMPK/mTOR pathway in A549 cells," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 86, no. 2, pp. 317–328, Jul. 2013.
- [288] A. Robaszekiewicz, A. Balcerczyk, and G. Bartosz, "Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells," *Cell Biol. Int.*, vol. 31, no. 10, pp. 1245–1250, Oct. 2007.
- [289] T. T. T. Nguyen, E. Tran, T. H. Nguyen, P. T. Do, T. H. Huynh, and H. Huynh, "The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 5, pp. 647–659, May 2004.

- [290] Y.-A. Kim, B. T. Choi, Y. T. Lee, D. I. Park, S.-H. Rhee, K.-Y. Park, and Y. H. Choi, "Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells," *Oncol. Rep.*, vol. 11, no. 2, pp. 441–446, Feb. 2004.
- [291] E. Pozo-Guisado, A. Alvarez-Barrientos, S. Mulero-Navarro, B. Santiago-Josefat, and P. M. Fernandez-Salguero, "The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 64, no. 9, pp. 1375–1386, Nov. 2002.
- [292] E. Pozo-Guisado, J. M. Merino, S. Mulero-Navarro, M. J. Lorenzo-Benayas, F. Centeno, A. Alvarez-Barrientos, P. M. Fernandez-Salguero, and P. M. F. Salguero, "Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB," *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 115, no. 1, pp. 74–84, May 2005.
- [293] Y. Wang, L. Ding, X. Wang, J. Zhang, W. Han, L. Feng, J. Sun, H. Jin, and X. J. Wang, "Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–51, Jan. 2012.
- [294] J. A. Alosi, D. E. McDonald, J. S. Schneider, A. R. Privette, and D. W. McFadden, "Pterostilbene inhibits breast cancer in vitro through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis," *J. Surg. Res.*, vol. 161, no. 2, pp. 195–201, Jun. 2010.
- [295] J. Duo, G.-G. Ying, G.-W. Wang, and L. Zhang, "Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation," *Mol. Med. Rep.*, vol. 5, no. 6, pp. 1453–1456, Jun. 2012.
- [296] C.-C. Chou, J.-S. Yang, H.-F. Lu, S.-W. Ip, C. Lo, C.-C. Wu, J.-P. Lin, N.-Y. Tang, J.-G. Chung, M.-J. Chou, Y.-H. Teng, and D.-R. Chen, "Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 33, no. 8, pp. 1181–1191, Aug. 2010.
- [297] J.-Y. Fang, Z.-H. Li, Q. Li, W.-S. Huang, L. Kang, and J.-P. Wang, "Resveratrol affects protein kinase C activity and promotes apoptosis in human colon carcinoma cells," *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*, vol. 13, no. 12, pp. 6017–6022, 2012.
- [298] C. Hope, K. Planutis, M. Planutiene, M. P. Moyer, K. S. Johal, J. Woo, C. Santoso, J. A. Hanson, and R. F. Holcombe, "Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 52 Suppl 1, pp. S52–61, Jun. 2008.
- [299] M. E. Juan, U. Wenzel, H. Daniel, and J. M. Planas, "Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 12, pp. 4813–4818, Jun. 2008.
- [300] S. Paul, A. M. Rimando, H. J. Lee, Y. Ji, B. S. Reddy, and N. Suh, "Anti-inflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 MAPK pathway in colon cancer cells," *Cancer Prev. Res. Phila. Pa*, vol. 2, no. 7, pp. 650–657, Jul. 2009.
- [301] H.-J. Kim, S.-K. Kim, B.-S. Kim, S.-H. Lee, Y.-S. Park, B.-K. Park, S.-J. Kim, J. Kim, C. Choi, J.-S. Kim, S.-D. Cho, J.-W. Jung, K.-H. Roh, K.-S. Kang, and J.-Y. Jung, "Apoptotic Effect of Quercetin on HT-29 Colon Cancer Cells via the AMPK Signaling Pathway," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 15, pp. 8643–8650, Aug. 2010.
- [302] Z. Li and Q. Gao, "Induction of apoptosis in HT-29 cells by quercetin through mitochondria-mediated apoptotic pathway," *Anim. Cells Syst.*, vol. 17, no. 3, pp. 147–153, 2013.

- [303] M. Y. Kim, "Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol," *Mol. Med. Rep.*, Nov. 2011.
- [304] L. Whyte, Y.-Y. Huang, K. Torres, and R. G. Mehta, "Molecular Mechanisms of Resveratrol Action in Lung Cancer Cells Using Dual Protein and Microarray Analyses," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 12007–12017, Dec. 2007.
- [305] Y.-A. Kim, W. H. Lee, T. H. Choi, S.-H. Rhee, K.-Y. Park, and Y. H. Choi, "Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF-kappaB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells," *Int. J. Oncol.*, vol. 23, no. 4, pp. 1143–1149, Oct. 2003.
- [306] M.-J. Hsieh, C.-W. Lin, S.-F. Yang, G.-T. Sheu, Y.-Y. Yu, M.-K. Chen, and H.-L. Chiou, "A Combination of Pterostilbene With Autophagy Inhibitors Exerts Efficient Apoptotic Characteristics in Both Chemosensitive and Chemoresistant Lung Cancer Cells," *Toxicol. Sci.*, p. kft238, Oct. 2013.
- [307] F. Cecconi and B. Levine, "The Role of Autophagy in Mammalian Development," *Dev. Cell*, vol. 15, no. 3, pp. 344–357, Sep. 2008.
- [308] S. K. Manna, A. Mukhopadhyay, and B. B. Aggarwal, "Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription Factors NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 12, pp. 6509–6519, Jun. 2000.
- [309] J. Carretero, E. Obrador, J. M. Esteve, A. Ortega, J. A. Pellicer, F. V. Sempere, and J. M. Estrela, "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.*, vol. 276, no. 28, pp. 25775–25782, Jul. 2001.
- [310] R. Kachadourian and B. J. Day, "Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 65–76, Jul. 2006.
- [311] J. Ø. Moskaug, H. Carlsen, M. C. W. Myhrstad, and R. Blomhoff, "Polyphenols and glutathione synthesis regulation," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, no. 1 Suppl, p. 277S–283S, Jan. 2005.
- [312] M. C. W. Myhrstad, H. Carlsen, O. Nordström, R. Blomhoff, and J. Ø. Moskaug, "Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, no. 5, pp. 386–393, Mar. 2002.
- [313] M. D'Incalci, W. P. Steward, and A. J. Gescher, "Use of cancer chemopreventive phytochemicals as antineoplastic agents," *Lancet Oncol.*, vol. 6, no. 11, pp. 899–904, Nov. 2005.
- [314] S. C. Thomasset, D. P. Berry, G. Garcea, T. Marczylo, W. P. Steward, and A. J. Gescher, "Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties," *Int. J. Cancer*, vol. 120, no. 3, pp. 451–458, Feb. 2007.
- [315] J. A. Ross, "Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 9, pp. 4411–4413, Apr. 2000.
- [316] R. Strick, P. L. Strissel, S. Borgers, S. L. Smith, and J. D. Rowley, "Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 9, pp. 4790–4795, Apr. 2000.

